

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ mRNA ΓΟΝΙΔΙΩΝ  
ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΛΙΠΟΛΥΣΗ ΣΤΟ ΛΙΠΩΔΗ ΙΣΤΟ  
ΠΑΧΥΣΑΡΚΩΝ ΚΑΙ ΛΕΠΤΩΝ ΑΤΟΜΩΝ**

**EFFECT OF EXERCISE ON mRNA LEVELS OF GENES RELATED TO  
LIPOLYSIS IN ADIPOSE TISSUE OF OBESE AND LEAN SUBJECTS**

**Διπλωματική εργασία της  
Ανατολής Π. Πετρίδου**

**Καθηγητής Κουρέτας Δημήτριος (επιβλέπων)**

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Λάρισα, 2013

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ mRNA ΓΟΝΙΔΙΩΝ  
ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΛΙΠΟΛΥΣΗ ΣΤΟ ΛΙΠΩΔΗ ΙΣΤΟ  
ΠΑΧΥΣΑΡΚΩΝ ΚΑΙ ΛΕΠΤΩΝ ΑΤΟΜΩΝ**

**EFFECT OF EXERCISE ON mRNA LEVELS OF GENES RELATED TO  
LIPOLYSIS IN ADIPOSE TISSUE OF OBESE AND LEAN SUBJECTS**

**Διπλωματική εργασία της  
Ανατολής Π. Πετρίδου**

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή**

Δημήτρης Κουρέτας, καθηγητής, ΤΒΒ, ΠΘ (επιβλέπων)

---

Βασίλης Μούγιος, καθηγητής ΤΕΦΑΑ, ΑΠΘ

---

Δημήτρης Στάγκος, λέκτορας ΤΒΒ, ΠΘ

---

Λάρισα, 2013

Στην αναζήτηση...

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Είναι γνωστό ότι η άσκηση αποτελεί έναν από τους αποτελεσματικότερους και φυσικούς τρόπους αύξησης της λιπόλυσης στο λιπώδη ιστό και, κατά συνέπεια, αντιμετώπισης της παχυσαρκίας. Παρότι είναι γνωστός ο μηχανισμός της λιπόλυσης, υπάρχουν λίγα δεδομένα για την επίδραση της άσκησης στους ξεχωριστούς παράγοντες-πρωταγωνιστές της λιπόλυσης στο λιπώδη ιστό, δεδομένα που θα διαλεύκαναν τον μηχανισμό επίδρασης της άσκησης στη μείωση της λιπώδους μάζας. Σε προηγούμενα πειράματά μας βρέθηκε ότι κατά τη διάρκεια οξείας άσκησης μέτριας έντασης αυξάνεται η υδρόλυση των τριακυλογλυκερολών του υποδόριου λιπώδους ιστού. Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η μελέτη της επίδρασης οξείας άσκησης μέτριας έντασης στα επίπεδα mRNA της λιπάσης των τριακυλογλυκερολών (ATGL), της ευαίσθητης σε ορμόνες λιπάσης (HSL), της λιπάσης των μονοακυλογλυκερολών (MGL), της περιλιπίνης-1 και της συγκριτικής ταυτοποίησης γονιδίου 58 (CGI-58) στο υποδόριο λιπώδη ιστό λεπτών και παχύσαρκων ανδρών. Στην έρευνα έλαβαν μέρος 7 λεπτοί (δείκτης σωματικής μάζας  $< 25 \text{ kg/m}^2$ , ποσοστό σωματικού λίπους  $< 15 \%$ ) και 7 παχύσαρκοι (δείκτης σωματικής μάζας  $> 30 \text{ kg/m}^2$ , ποσοστό σωματικού λίπους  $> 20 \%$ ) νέοι άντρες, οι οποίοι ποδηλάτησαν για 30 min σε καρδιακή συχνότητα 125-130 σφ/min. Πραγματοποιήθηκε βιοψία λιπώδους ιστού από την γλουτιαία περιοχή σε ηρεμία, στο 10ο, στο 20ό και στο 30ό λεπτό της άσκησης. Απομονώθηκε το RNA του λιπώδους ιστού, μετατράπηκε σε cDNA και με PCR πραγματικού χρόνου μετρήθηκαν τα επίπεδα mRNA των υπό μελέτη γονιδίων. Η PCR πραγματικού χρόνου δεν έδειξε αλλαγές στα επίπεδα mRNA των τριών λιπασών, ATGL, HSL και MGL, καθώς και των πρωτεϊνών σκαλωσιάς (scaffold proteins), περιλιπίνης-1 και CGI-58, κατά τη διάρκεια της 30λεπτης άσκησης. Σε ό,τι αφορά τη σύγκριση των επιπέδων mRNA των υπό μελέτη γονιδίων μεταξύ παχύσαρκων και λεπτών ατόμων, βρέθηκε ότι τα παχύσαρκα άτομα είχαν χαμηλότερα επίπεδα mRNA της ATGL, της HSL και της CGI-58, ενώ δεν βρέθηκαν διαφορές μεταξύ των δυο ομάδων στα επίπεδα mRNA της MGL και της περιλιπίνης-1. Συνοψίζοντας, 30λεπτη άσκηση μέτριας έντασης δεν προκάλεσε μεταβολές στα επίπεδα mRNA της ATGL, της HSL, της MGL, της περιλιπίνης-1 και της CGI-58 στο λιπώδη ιστό λεπτών και παχύσαρκων ανδρών, παρόλο που η λιπόλυση ήταν σημαντικά αυξημένη κατά τη διάρκεια της άσκησης και στις δυο ομάδες. Το εύρημα αυτό υποδεικνύει ότι η αυξημένη λιπόλυση που βρέθηκε στο λιπώδη ιστό κατά τη διάρκεια σύντομης οξείας άσκησης δεν υποστηρίζεται από αύξηση των επιπέδων mRNA των γονιδίων πρωταγωνιστών της λιπόλυσης, αλλά οφείλεται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως είναι η αντιστρεπτή φωσφορυλίωση της HSL και της περιλιπίνης-1.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	iv
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ .....	v
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	1
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ .....	2
Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη λιπόλυση του λιπώδους ιστού.....	2
Ορμονική ρύθμιση της λιπόλυσης του λιπώδους ιστού.....	4
Η τύχη των προϊόντων της λιπόλυσης.....	6
Λιπόλυση και παχυσαρκία.....	6
Λιπόλυση και άσκηση .....	7
Το σκηνικό της λιπόλυσης κατά την άσκηση.....	10
Γονιδιακή έκφραση και λιπόλυση στο λιπώδη ιστό .....	12
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ .....	13
ΜΕΘΟΔΟΣ .....	14
Δείγμα .....	14
Προκαταρκτικές μετρήσεις .....	14
Πρωτόκολλο άσκησης .....	14
Βιοψία .....	15
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	15
PCR αντίστροφης μεταγραφής (Reverse transcription-PCR, RT-PCR).....	17
Η PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR).....	17
Απομόνωση RNA .....	21
Μέτρηση RNA.....	22
cDNA σύνθεση .....	22
PCR πραγματικού χρόνου (taqMan) .....	22
Στατιστική επεξεργασία .....	24
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	25
ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	27
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	29

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το 95% σχεδόν του ανθρώπινου σωματικού λίπους βρίσκεται στον λιπώδη ιστό, ενώ μικρές ποσότητες αποθηκεύονται στο μυ, στο ήπαρ και στο πάγκρεας (Jocken & Blaak 2008). Το μεγαλύτερο τμήμα των ώριμων λιποκυττάρων, των κυττάρων του λιπώδους ιστού, καταλαμβάνεται από ένα σταγονίδιο λίπους. Το σταγονίδιο φτάνει τα 100 μm σε διάμετρο και αποτελείται από έναν πυρήνα τριακυλογλυκερολών περιβαλλόμενο από μια μονοστοιβάδα φωσφολιπιδίων και χοληστερόλης με διάφορες ενσωματωμένες πρωτεΐνες (Brasaemle et al. 2004). Τα σταγονίδια λίπους θεωρούνται δυναμικά οργανίδια που παίζουν κρίσιμο ρόλο στη διαχείριση των κυτταρικών αποθεμάτων λίπους και των λιπολυτικών διεργασιών (Lafontan & Langin 2009). Οι τριακυλογλυκερόλες που βρίσκονται στα σταγονίδια λίπους των λιποκυττάρων του λιπώδους ιστού των σπονδυλωτών ζώων αποτελούν την αφθονότερη ενεργειακή αποθήκη. Η υδρόλυση των τριακυλογλυκερολών προς λιπαρά οξέα και γλυκερόλη ονομάζεται λιπόλυση και τα λιπαρά οξέα που προκύπτουν αποτελούν το κύριο ενεργειακό καύσιμο σε κατάσταση ηρεμίας, νηστείας και χαμηλής έντασης σωματική άσκηση.

Ανισορροπία μεταξύ της υδρόλυσης και της σύνθεσης των τριακυλογλυκερολών υπέρ της δεύτερης αυξάνει την εναπόθεση σωματικού λίπους και οδηγεί στην παχυσαρκία, η οποία παίρνει επιδημικές διαστάσεις σε πολλές χώρες και θεωρείται παράγοντας κινδύνου για ασθένειες όπως ο διαβήτης και τα καρδιαγγειακά προβλήματα. Επομένως, η μείωση του σωματικού λίπους είναι επιδίωξη σημαντικού μέρους του πληθυσμού, κυρίως για λόγους υγείας. Ωστόσο, στόχοι αυτής της επιδίωξης είναι και η βελτίωση της εξωτερικής εμφάνισης, της απόδοσης σε διάφορες σωματικές δραστηριότητες και, ειδικά για τους αθλητές, η αύξηση της αθλητικής απόδοσης. Εξαιτίας της σύνδεσης μεταξύ των επιπέδων των κυκλοφορούντων ελεύθερων λιπαρών οξέων και της ανάπτυξης της αντίστασης στην ινσουλίνη και του μεταβολικού συνδρόμου (Boden 1997, Frayn 2001), η λιπόλυση στο λιπώδη ιστό (που αποτελεί την κύρια πηγή των κυκλοφορούντων λιπαρών οξέων) αποτελεί στόχο της φαρμακοβιομηχανίας. Η άσκηση και η υποενεργειακή διατροφή αποτελούν τους δύο φυσικούς τρόπους μείωσης του σωματικού λίπους. Επομένως, η αναζήτηση των μοριακών μηχανισμών μέσω των οποίων η άσκηση μειώνει το σωματικό λίπος μπορεί να οδηγήσει στην πιο αποτελεσματική αντιμετώπιση της παχυσαρκίας και των συνοδών προβλημάτων της.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

### Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη λιπόλυση στο λιπώδη ιστό

Η υδρόλυση των τριακυλογλυκερολών στο λιπώδη ιστό ολοκληρώνεται με τη δράση τριών λιπασών: της λιπάσης των τριακυλογλυκερολών του λιπώδους ιστού (adipose triacylglycerol lipase, ATGL), της ευαίσθητης σε ορμόνες λιπάσης (hormone-sensitive lipase, HSL) και της λιπάσης των μονοακυλογλυκερολών (monoacylglycerol lipase, MGL). Μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν η HSL το αποκλειστικό και καθοριστικό ένζυμο της υδρόλυσης των τριακυλογλυκερολών στο λιπώδη ιστό. Νέα δεδομένα παρουσιάζουν την συμμετοχή και μιας άλλης λιπάσης στη διάσπαση των τριακυλογλυκερολών στο λιπώδη ιστό, της ATGL, αν και ο ρόλος και η σπουδαιότητά της στη ρύθμιση της λιπόλυσης είναι υπό συζήτηση (Langin et al. 2005, Mairal et al. 2006). Από τη μια πλευρά προτείνεται ότι η ATGL ρυθμίζει την υδρόλυση των τριακυλογλυκερολών μόνο κατά την βασική λιπόλυση και ότι η HSL είναι η κύρια λιπάση που καταλύει το καθοριστικό βήμα (την υδρόλυση των τριακυλογλυκερολών προς διακυλογλυκερόλες) της προκαλούμενης από κατεχολαμίνες λιπόλυσης στον άνθρωπο (Langin et al. 2005, Ryden et al. 2007). Από την άλλη πλευρά, έχει προταθεί ότι η ATGL παίζει ρυθμιστικό ρόλο σε συνεργασία με την HSL κι ότι οι δυο λιπάσες μαζί ευθύνονται για την υδρόλυση τουλάχιστον του 95% των αποθηκευμένων τριακυλογλυκερολών (Schweiger et al. 2006).

Η ATGL, με την επίσημη ονομασία Patatin-like phospholipase domain-containing protein 2 (UniProt Q96AD5), είναι μια πρωτεΐνη 506 αμινοξέων με μοριακό βάρος 54 kDa (Mairal et al. 2006). Με το υδρόφοβο τμήμα της (αμινοξέα 315 έως 360) μεσολαβεί στην πρόσδεση με το σταγονίδιο λίπους, ενώ στην καρβοξυτελική περιοχή του ενζύμου (Ser404 και Ser428) βρίσκονται οι θέσεις φωσφορυλίωσής της (Lafontan & Langin 2009, Pagnon et al. 2012). Η ATGL παρουσιάζει 10 φορές υψηλότερη εξειδίκευση προς τις τριακυλογλυκερόλες σε σχέση με τις διακυλογλυκερόλες. Η ATGL προμηθεύει διακυλογλυκερόλες στην HSL σε συνθήκες βασικές και διέγερσης, παρόλο που η HSL έχει την δυνατότητα από μόνη της να υδρολύει τον πρώτο εστερικό δεσμό των τριακυλογλυκερολών (Bezaire et al. 2009). Η ATGL ενεργοποιείται μέσω της πρωτεΐνης της συγκριτικής ταυτοποίησης γονιδίου 58 (comparative gene identification 58, CGI-58) (Lass et al. 2006) και η αναστρέψιμη πρόσδεση της CGI-58 με την περιλιπίνη-1 αποτελεί έναν έμμεσο μηχανισμό ρύθμισης της δραστηριότητας της ATGL από την πρωτεϊνική κινάση A (protein kinase A, PKA) (Subramanian et al. 2004, Yamaguchi et al. 2004).

Η HSL (UniProt Q05469) είναι πρωτεΐνη 776 αμινοξέων με μοριακό βάρος 84 kDa (Kraemer & Shen 2002). Η HSL των λιποκυττάρων αποτελείται από μια αμινοτελική περιοχή

που αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες, μια καρβοξυτελική καταλυτική περιοχή που αποτελείται από την καταλυτική τριάδα Ser, Asp και His, και από την ρυθμιστική μονάδα του ενζύμου που περιέχει τις θέσεις φωσφορυλίωσης (Lafontan & Langin 2009). Η αμινοτελική περιοχή αλληλεπιδρά με την δεσμεύουσα λιπαρά οξέα πρωτεΐνη-4 (fatty acid binding protein-4, FABP4). Με φωσφορυλίωσή της, η HSL ενεργοποιείται, ενώ η μετατόπιση του ενεργοποιημένου ενζύμου από το κυτταρόπλασμα προς το σταγονίδιο λίπους αποτελεί καθοριστικό βήμα της λιπόλυσης (Granneman et al. 2007).

Η MGL (UniProt Q99685) αποτελείται από 303 αμινοξέα κι έχει μοριακό βάρος 33 kDa. Η δράση της MGL απαιτείται στο τελικό στάδιο της λιπόλυσης, στην υδρόλυση των 2-μονοακυλογλυκερολών που παράγονται από την δράση της HSL (Fredrikson et al. 1976). Η MGL υδρολύει τους 1(3) και 2-εστερικούς δεσμούς των μονοακυλογλυκερολών με ίδιους ρυθμούς και δεν έχει καταλυτική δράση στις διακυλογλυκερόλες, στις τριακυλογλυκερόλες ή στους εστέρες χοληστερόλης. Τα καταλυτικά της κατάλοιπα Ser122, Asp239 και His269, επιβεβαιώθηκαν με πειράματα μεταλλαξιγένεσης (Karlsson et al. 1997). Σε αντίθεση με την ATGL και την HSL, η MGL δεν υπόκειται σε ορμονικό έλεγχο (Jocken & Blaak 2008).

Για να πραγματοποιηθεί η λιπόλυση απαιτείται οι υδατοδιαλυτές κυτταροπλασματικές λιπάσες (ATGL και HSL) να έρθουν σε επαφή με τα υδρόφοβα υποστρώματά τους, τις τριακυλογλυκερόλες, οι οποίες προστατεύονται από πρωτεΐνες που περιβάλλουν το σταγονίδιο λίπους των λιποκυττάρων. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι οι περιλιπίνες, που ελέγχουν την πρόσβαση των λιπασών στις τριακυλογλυκερόλες του σταγονιδίου (Greenberg et al. 1991). Μάλιστα, δόθηκε το όνομα περιλιπίνη από το "περί λίπος", επειδή περιβάλλει το σταγονίδιο λίπους (Kimmel et al. 2010). Στον άνθρωπο, η περιλιπίνη εκφράζεται σε τρεις διαφορετικές ισομορφές, τις 1, 2 και 3, με εναλλακτικά ματίσματα του mRNA ενός γονιδίου, με την περιλιπίνη-1 (UniProt O60240) να είναι η αφθονότερη στα σταγονίδια λίπους των λιποκυττάρων (Brasaemle et al. 2009). Οι περιλιπίνες παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στην αποθήκευση όσο και στην υδρόλυση των τριακυλογλυκερολών στα λιποκύτταρα (Brasaemle et al. 2009). Με την ορμονική διέγερση των αδρενεργικών υποδοχέων στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των λιποκυττάρων, η περιλιπίνη-1 φωσφορυλιώνεται από την PKA στο κατάλοιπο Ser517 (Miyoshi et al. 2006), αλλάζει διαμόρφωση και προάγει την λιπόλυση μέσω της σύνδεσης της HSL στο σταγονίδιο λίπους, δρώντας έτσι ως πρωτεΐνη σκαλωσιάς για την HSL (Granneman et al. 2007). Η φωσφορυλίωση της HSL και της περιλιπίνης-1 οδηγεί στη μετατόπιση της HSL από το κυτταρόπλασμα στην επιφάνεια του σταγονιδίου λίπους (Jocken & Blaak 2008). Η περιλιπίνη-1 εμπλέκεται και στη ρύθμιση της ATGL μέσω αλληλεπίδρασής της με μια πρωτεΐνη ενεργοποιητή της ATGL, την CGI-58 (Granneman et al. 2009). Λιποκύτταρα με



έλλειψη περιλιπίνης-1 δεν εμφανίζουν μετατόπιση της HSL προς το σταγονίδιο λίπους μετά από αύξηση των επιπέδων της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP) (Sztalryd et al. 2003). Μια άλλη άφθονη πρωτεΐνη της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των λιποκυττάρων και της μεμβράνης του σταγονιδίου λίπους είναι η καβεολίνη-1, η οποία αυξάνει τη λιπόλυση συμμετέχοντας στη φωσφορυλίωση της περιλιπίνης (Cohen et al. 2004).

Επιπλέον, έχουν εντοπιστεί δύο πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την HSL και αυξάνουν την λιπολυτική της δράση: η FABP4, γνωστή και ως ALBP ή aP2, και η λιποτρανσίνη. Η FABP4, πέρα από το ότι συμμετέχει στη μεταφορά των λιπαρών οξέων στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, όταν είναι δεσμευμένη με λιπαρά οξέα, συνδέεται με την ενεργοποιημένη, φωσφορυλιωμένη HSL στην επιφάνεια του σταγονιδίου λίπους (Lafontan & Langin 2009). Έλλειψη της FABP4 συνοδεύεται από μείωση της λιπόλυσης και αύξηση των λιπαρών οξέων στα λιποκύτταρα (Coe et al. 1999). Η λιποτρανσίνη συμβάλλει στη μετατόπιση και αγκυροβόληση της HSL στη μεμβράνη του σταγονιδίου λίπους (Shen et al. 2001, Syu & Saltiel 1999).

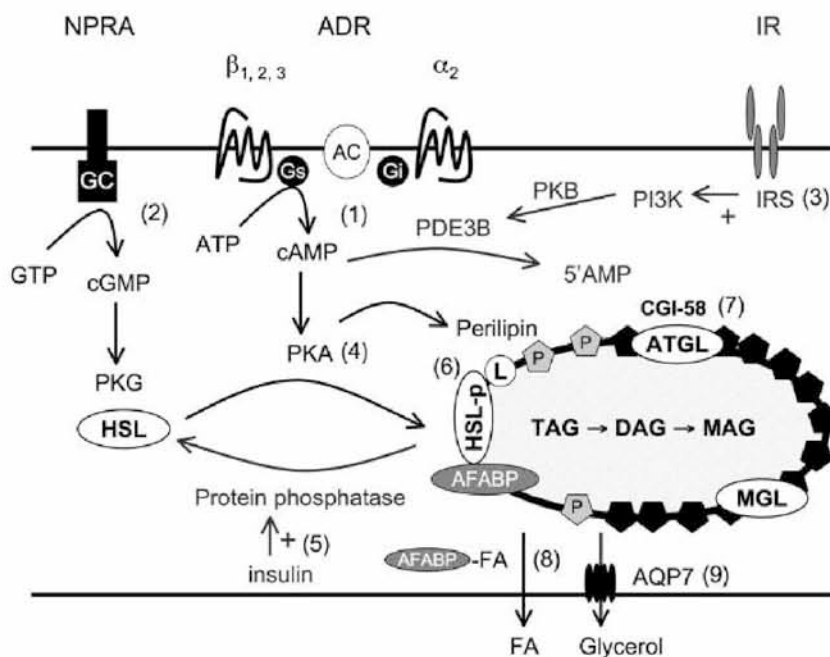
Μια άλλη πρωτεΐνη που σχετίζεται με την λιπόλυση είναι η CGI-58, γνωστή και ως alpha/beta-hydrolase domain-containing protein (ABHD5, UniProt Q8WTS1), η οποία αλληλεπιδρά με κι ενεργοποιεί την ATGL (Lass et al. 2006). Μελέτες αποσιώπησης της CGI-58 σε ανθρώπινα λιποκύτταρα έδειξαν ότι η λιπολυτική δράση της ATGL εξαρτάται από την CGI-58 (Bezaire et al. 2009). Η CGI-58 είναι μια πρωτεΐνη 349 αμινοξέων με μοριακό βάρος 40 kDa, που προσδένεται στα σταγονίδια λίπους μέσω αλληλεπίδρασης με την περιλιπίνη-1 σε μη ενεργοποιημένα λιποκύτταρα (Lafontan & Langin 2009). Με την αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων της cAMP, η CGI-58 απομακρύνεται από την περιλιπίνη προς το κυτταρόλυμα. Σε αντίθεση με την CGI-58, που είναι ενεργοποιητής της ATGL, μια πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το G(0)/G(1) switch gene 2 (G0S2) και εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα λιποκύτταρα, έχει βρεθεί ότι αναστέλλει τη δράση της ATGL (Yang et al. 2010). Τελειώνοντας με τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη διεργασία της λιπόλυσης, η ακουαπορίνη 7 αποτελεί κανάλι εξόδου της γλυκερόλης από τα λιποκύτταρα, φωσφορυλιώνεται από την PKA κι έχει βρεθεί ότι έλλειψή της οδηγεί σε υπερτροφία των λιποκυττάρων και παχυσαρκία (Lafontan & Langin 2009).

### **Ορμονική ρύθμιση της λιπόλυσης**

Η λιπόλυση ελέγχεται κεντρικά με τη δράση διαφόρων ορμονών. Οι κατεχολαμίνες επηρεάζουν τη λιπόλυση μετά από πρόσδεσή τους σε αδρενεργούς υποδοχείς ( $\beta_{1-3}$  και  $\alpha_{1-2}$ ) που συνδέονται με G-πρωτεΐνες. Και οι τρεις  $\beta$ -αδρενεργοί υποδοχείς είναι λειτουργικοί στον ανθρώ-

πινο λιπώδη ιστό, αλλά οι  $\beta_1$  και  $\beta_2$  είναι οι πιο ενεργοί (Barbe et al. 1996). Οι  $\beta$ -αδρενεργοί υποδοχείς, μέσω σύνδεσής τους με τις διεγερτικές G ( $G_s$ ) πρωτεΐνες, ενεργοποιούν την αδενοσυλική κυκλάση, με αποτέλεσμα την αύξηση της cAMP. Η αύξηση αυτή ενεργοποιεί την PKA, που οδηγεί στη φωσφορυλίωση κι ενεργοποίηση της HSL και της περιλιπίνης. Οι  $\alpha_2$  αδρενεργοί υποδοχείς συνδέονται με τις ανασταλτικές G ( $G_i$ ) πρωτεΐνες, οι οποίες απενεργοποιούν την αδενοσυλική κυκλάση, με αποτέλεσμα τη μείωση της cAMP και την αναστολή της PKA (Jocken & Blaak 2008).

Από την άλλη πλευρά, η ινσουλίνη ενεργοποιεί μέσω φωσφορυλίωσης τη φωσφοδιεστεράση 3B (PDE3B), η οποία μειώνει τα επίπεδα της cAMP (Holm et al. 2000). Επιπλέον, η ινσουλίνη αυξάνει τη δραστηριότητα πρωτεϊνικών φωσφατασών που αποφωσφορυλιώνουν την HSL (Stralfors & Honnor 1989). Με τους τρόπους αυτούς η ινσουλίνη αναστέλλει τη λιπολυτική δράση των κατεχολαμινών (Nilsson et al. 1980). Μια ακόμη δράση της ινσουλίνης σε βάρος της λιπόλυσης είναι η αύξηση του ρυθμού επανεστεροποίησης των λιπαρών οξέων στο λιπώδη ιστό (Zierath et al. 1998, Evans et al. 1999). Στο Σχήμα 1 παρουσιάζονται τα σημεία ελέγχου της λιπόλυσης στο λιπώδη ιστό.



**Σχήμα 1.** Το λιπολυτικό μονοπάτι στα λιποκύτταρα (Jocken & Blaak 2008). (1) Οι κατεχολαμίνες δρουν στους αδρενεργούς υποδοχείς (ADR) είτε ενεργοποιώντας είτε αναστέλλοντας την αδενοσυλική κυκλάση (AC), αντίδραση που ελέγχεται από τις διεγερτικές ( $G_s$ ) ή τις ανασταλτικές ( $G_i$ ) G-πρωτεΐνες. (2) Τα κολπικά νατριουρητικά πεπτιδία ασκούν την λιπολυτική τους δράση μέσω της γουανυλικής κυκλάσης (GC) με πρόσδεσή τους στον υποδοχέα τους, NPRA. Η επακόλουθη αύξηση της κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης (cGMP) και η ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης G (PKG) προκαλεί την φωσφορυλίωση της ευαίσθητης σε ορμόνες λιπάσης (HSL). (3) Η πρόσδεση της ινσουλίνης στους υποδοχείς της (IR) οδηγεί στην ενεργοποίηση των υποστρωμάτων τους (IRS), ενεργοποιώντας την κινάση της 3-φωσφατιδυλνινοσιτόλης (PI3K) και την επακόλουθη φωσφορυλίωση της φωσφοδιεστεράσης 3B (PDE3B) από την πρωτεϊνική κινάση B (PKB). Η PDE3B υδρολύει την κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cAMP) που παράγεται από την AC της, μετατρέποντάς τη σε 5'AMP. (4) Η cAMP

ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση A (PKA), η οποία φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί με τη σειρά της τουλάχιστον δύο υποστρώματα: την HSL και την περιλιπίνη (P). Η φωσφορυλίωση της HSL και της περιλιπίνης οδηγεί στη μετατόπιση της HSL από το κυτταρόπλασμα στην επιφάνεια του σταγονιδίου λίπους. (5) Η ινσουλίνη ενεργοποιεί πρωτεϊνικές φωσφατάσες που προκαλούν την αποφωσφορυλίωση της HSL. (6) Στην επιφάνεια του σταγονιδίου λίπους εμφανίζεται αλληλεπίδραση μεταξύ της φωσφορυλιωμένης HSL (HSL-p) και της λιποτρανσίνης (L). (7) Αντί της φωσφορυλίωσης και της μετατόπισης τίνος, μια ενεργοποιός πρωτεΐνη (comparative gene identification 58, CGI-58) ενεργοποιεί την λιπάση των τριακυλογλυκερολών του λιπώδους ιστού (ATGL). (8) Αλληλεπίδραση της HSL με την δεσμεύουσα λιπαρά οξέα πρωτεΐνη των λιποκυττάρων (AFABP) ευνοεί μια γρήγορη απελευθέρωση των λιπαρών οξέων (FA) στην αιματική κυκλοφορία. (9) Η απελευθέρωση της γλυκερόλης από το λιποκύτταρο ελέγχεται από την ακουαπορίνη 7 (AQP7).

### **Η τύχη των προϊόντων της λιπόλυσης στο λιπώδη ιστό**

Τα λιπαρά οξέα που παράγονται από την λιπόλυση στο λιπώδη ιστό είναι δυσδιάλυτα στο νερό και γι' αυτό μεταφέρονται στο αίμα δεσμευμένα από την αλβουμίνη. Μέσω του αίματος καταλήγουν σε άλλους ιστούς (κυρίως στο ήπαρ και στους μύες), όπου είτε οξειδώνονται για παραγωγή ενέργειας είτε χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση άλλων λιπιδίων. Η τύχη της γλυκερόλης που προκύπτει από τη λιπόλυση βρίσκεται έξω από τα λιποκύτταρα, αφού δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανασύνθεση τριακυλογλυκερολών ή για παραγωγή ενέργειας μέσω της οξείδωσής της λόγω απουσίας του ενζύμου, κινάση της γλυκερόλης. Έτσι, μεταφέρεται μέσω του αίματος και προσλαμβάνεται κυρίως από το ήπαρ για παραγωγή γλυκόζης (Martin 1996).

### **Λιπόλυση και παχυσαρκία**

Ενώ επικρατεί η άποψη ότι στην παχυσαρκία παρατηρούνται αυξημένες συγκεντρώσεις λιπαρών οξέων στο πλάσμα και αυξημένος ρυθμός λιπόλυσης κατά τη νηστεία, όταν λαμβάνεται υπόψη η λιπώδης μάζα, οι αυξήσεις αυτές εξαλείφονται (Bickerton et al. 2008). Μάλιστα, παρατηρείται μειωμένη λιπόλυση στον υποδόριο λιπώδη ιστό σε παχύσαρκα άτομα, κάτι που μπορεί να αποτελεί μηχανισμό προσαρμογής για τη μείωση των λιπαρών οξέων του πλάσματος (Lafontan & Langin 2009).

Η ανάπτυξη της παχυσαρκίας αποδίδεται και σε αλλοιώσεις του συμπαθητικού νευρικού συστήματος. Για παράδειγμα, μειωμένη αποτελεσματικότητα των β-αδρενεργών υποδοχέων ή/και αυξημένη δράση των αντιλιπολυτικών α<sub>2</sub>-αδρενεργών υποδοχέων οδηγούν σε μείωση της λιπόλυσης και σε προαγωγή της παχυσαρκίας (Bartness & Song 2007). Έτσι, στην παχυσαρκία παρατηρείται μειωμένη διέγερση της λιπόλυσης μέσω των β-αδρενεργών υποδοχέων στο λιπώδη ιστό και αυξημένη αντιλιπολυτική δράση μέσω των α<sub>2</sub>-αδρενεργών υποδοχέων (Schiffelers et al. 2001, Stich et al. 2000). Επίσης, έχει βρεθεί ότι παχύσαρκα άτομα, σε σύγκριση με λεπτά άτομα, έχουν μειωμένα επίπεδα νατριουρητικών πεπτιδίων, τα οποία δρουν λιπολυτικά (Wang et al. 2004).

Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι παχύσαρκα άτομα εμφανίζουν μειωμένη προκαλούμενη από τη νορεπινεφρίνη λιπόλυση και μειωμένα επίπεδα HSL, ενώ η πρωτεϊνική έκφραση της ATGL είναι αμετάβλητη (Ryden et al. 2007). Εκτός από μειωμένη έκφραση της HSL, έχει αναφερθεί και μειωμένη δραστηριότητά της στην παχυσαρκία (Large et al. 1999). Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί χαμηλότερη έκφραση της περιλιπίνης-1 στο λιπώδη ιστό παχύσαρκων ατόμων (Wang et al. 2003, Ray et al. 2009), η οποία έχει αποδοθεί σε πιθανό προσαρμοστικό μηχανισμό του οργανισμού στην προσπάθεια μείωσης της παχυσαρκίας (Beylot et al. 2012). Ωστόσο, δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμη αν η φωσφορυλίωση και η επακόλουθη μετατόπιση της περιλιπίνης-1 και της HSL είναι μειωμένες στην παχυσαρκία (Jocken & Blaak 2008).

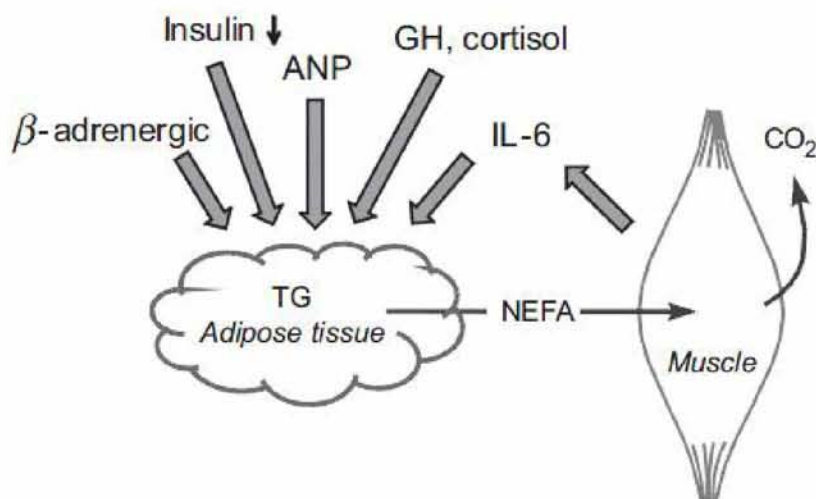
Σε ό,τι αφορά την αντιμετώπιση της παχυσαρκίας, υπάρχει το δίλημμα αν η ενεργοποίηση της λιπόλυσης θα έχει ως αποτέλεσμα περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης των ελεύθερων λιπαρών οξέων στο πλάσμα και επιβάρυνση της αντίστασης στην ινσουλίνη. Από την άλλη πλευρά, μείωση της λιπόλυσης δεν θα άφηνε περιθώριο για μείωση του αποθηκευμένου λίπους στον λιπώδη ιστό, που είναι η πηγή του προβλήματος της παχυσαρκίας. Γι' αυτό το λόγο, η άσκηση αποτελεί τον πιο αποτελεσματικό τρόπο μείωσης της παχυσαρκίας, διότι παράλληλα με την αύξηση της λιπόλυσης, αυξάνεται και η οξείδωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων.

### **Λιπόλυση και άσκηση**

Για τον ασκούμενο μυ υπάρχει μια σειρά αερόβιων πηγών ανασύνθεσης ATP (πηγών ενέργειας), όπως είναι το ενδομυϊκό και το ηπατικό γλυκογόνο, η γλυκόζη του πλάσματος και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα που προκύπτουν από τις τριακυλογλυκερόλες του λιπώδους ιστού, τις τριακυλογλυκερόλες των VLDL και τις ενδομυϊκές τριακυλογλυκερόλες (Hargreaves 2000). Η συμμετοχή αυτών των πηγών ενέργειας καθορίζεται κυρίως από την ένταση και τη διάρκεια της άσκησης. Με την έναρξη της μυϊκής συστολής αυξάνεται η παράδοση ελεύθερων λιπαρών οξέων από τον λιπώδη ιστό λόγω αύξησης της λιπόλυσης με συντονισμό από το συμπαθοαδρενεργικό σύστημα (Wahrenberg et al. 1987, Romijn et al. 1993, Klein et al. 1995, de Glisezinski et al. 1998a, Horowitz et al. 2000, Horowitz & Klein 2000, Mora-Rodriguez & Coyle 2000, Stich et al. 2000, Petridou et al. 2002, Moro et al. 2007, Ormsbee et al. 2007, Fernandez et al. 2008, Chatzinikolaou et al. 2008, Ogasawara et al. 2010). Ο ρυθμός λιπόλυσης στο λιπώδη ιστό είναι μεγαλύτερος σε χαμηλής έντασης (25 % της  $VO_2max$ ) άσκηση σε σύγκριση με υψηλότερης έντασης (65 ή 85 % της  $VO_2max$ ) άσκηση (Mora-Rodriguez & Coyle 2000) και, κατά τη διάρκεια χαμηλής έντασης άσκησης, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα που προκύπτουν από τη λιπόλυση στο λιπώδη ιστό αποτελούν την κύρια πηγή ενέργειας των α-

σκούμενων μυών. Όσο η άσκηση παρατείνεται, αυξάνεται και η σημασία των ελεύθερων λιπαρών οξέων, δεδομένου ότι η λιπόλυση αυξάνεται με την διάρκεια της άσκησης, ανεξάρτητα από την έντασή της (Romijn et al. 1993, Klein et al. 1995, de Glisezinski et al. 1998a, Horowitz et al. 2000, Mora-Rodriguez & Coyle 2000, Stich et al. 2000). Σε μέτριας έντασης άσκηση, πρόσθετες πηγές λιπών, όπως οι τριακυλογλυκερόλες του πλάσματος με τη δράση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης και οι ενδομυϊκές τριακυλογλυκερόλες, συμπληρώνουν με ελεύθερα λιπαρά οξέα τον ασκούμενο μυ. Η παράδοση των λιπαρών οξέων εμπλουτίζεται και από την αυξημένη αιματική ροή του λιπώδους ιστού και από τη συμμετοχή άλλων διεγερτών, όπως είναι τα νατριουρητικά πεπτιδία. Σε υψηλής έντασης άσκηση η παροχή ελεύθερων λιπαρών οξέων από το λιπώδη ιστό δεν καλύπτει τις ενεργειακές απαιτήσεις των μυών (σε συνδυασμό με τη μειωμένη ικανότητα των μυών να οξειδώνουν τα ελεύθερα λιπαρά οξέα). Ο περιορισμός στην παράδοση των ελεύθερων λιπαρών οξέων από το λιπώδη ιστό μπορεί να αποτελεί αναδραστική αναστολή της λιπόλυσης από την α-αδρενεργική αναστολή της λιπόλυσης σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις κατεχολαμινών (Frayn 2010).

Όπως αναφέρθηκε στην Εισαγωγή, η άσκηση αποτελεί έναν από τους φυσικούς τρόπους αύξησης της λιπόλυσης στο λιπώδη ιστό κι έναν από τους καλύτερους τρόπους αντιμετώπισης της παχυσαρκίας και των συνοδών προβλημάτων υγείας στον άνθρωπο. Η άσκηση πετυχαίνει την αύξηση της λιπόλυσης μέσω ορμονικής διέγερσης. Στο Σχήμα 2 παρουσιάζονται οι ορμόνες που συμμετέχουν στη ρύθμιση της λιπόλυσης στον λιπώδη ιστό κατά την άσκηση.



**Σχήμα 2.** Ορμονική διέγερση της λιπόλυσης στο λιπώδη ιστό κατά την άσκηση. ANP: κοιλικό νατριουρητικό πεπτιδίο, GH: αυξητική ορμόνη, IL-6: ιντερλευκίνη- 6, TG: τριακυλογλυκερόλες (Frayn 2010).

Έχει αποδειχθεί η σημαντικότητα των β-αδρενεργών υποδοχέων των λιποκυττάρων στη λιπόλυση κατά την άσκηση (Ameur et al. 1990) και αποκλεισμός των β-αδρενεργών υποδοχέων συνοδεύεται από μείωση της απόδοσης κατά την άσκηση (Frayn 2010). Αντίθετα, αποκλει-

σμός των β-αδρενεργών υποδοχέων κατά την ηρεμία δεν προκάλεσε διαφορές στη συγκέντρωση της γλυκερόλης στο πλάσμα, ενώ αποκλεισμός των α-αδρενεργών υποδοχέων αύξησε τη συγκέντρωση γλυκερόλης στο πλάσμα κατά την ηρεμία, ενώ δεν προκάλεσε διαφορές κατά την άσκηση (Frayn 2010). Από τις κατεχολαμίνες, η επινεφρίνη είναι ο κύριος αδρενεργικός παράγοντας που αυξάνει την λιπόλυση στον υποδόριο λιπώδη ιστό κατά την άσκηση, ενώ η νορεπινεφρίνη φαίνεται να μην συμβάλλει στην αυξημένη λιπόλυση κατά την άσκηση (de Glisezinski et al. 2009). Η λιπολυτική ικανότητα της επινεφρίνης, η οποία παρουσιάζει την μεγαλύτερη συνάφεια προς τους α<sub>2</sub>-αδρενεργούς υποδοχείς, μειώνεται στα λιποκύτταρα που εκφράζουν μεγάλο αριθμό α<sub>2</sub>-αδρενεργών υποδοχέων (Mauriège et al. 1987), ενώ και η ενεργοποίηση των α<sub>2</sub>-αδρενεργών υποδοχέων από την επινεφρίνη κατά την άσκηση εν μέρει αμβλύνει την λιπολυτική απόκριση στον λιπώδη ιστό (Stich et al. 1999). Με την άσκηση η έκκριση της ινσουλίνης μειώνεται, οπότε αίρεται η αντιλιπολυτική της δράση (Ranallo & Rhodes 1998, de Glisezinski et al. 2009). Εκτός από την ινσουλίνη, οι προσταγλανδίνες, το νικοτινικό οξύ, η αδενοσίνη, τα νευροπεπτίδια Υ και τα πεπτίδια ΥΥ εμφανίζουν αντιλιπολυτική δράση μέσω των G<sub>i</sub> υποδοχέων (Jocken & Blaak 2008).

Επιπρόσθετα, και οι συγκεντρώσεις της κορτιζόλης και της αυξητικής ορμόνης αυξάνονται κατά τη διάρκεια της άσκησης. Η έγχυση κορτιζόλης ενεργοποιεί τη λιπόλυση, ενώ η λιπολυτική δράση της αυξητικής ορμόνης εμφανίζεται 2 ώρες μετά την έγχυσή της με αποτέλεσμα ο λιπολυτικός της ρόλος να αφορά παρατεταμένες ασκήσεις (Frayn 2010). Εκτός από τις κατεχολαμίνες, έχει βρεθεί ότι και τα νατριουρητικά πεπτίδια, κοιλιακό νατριουρητικό πεπτίδιο (ANP), που εκκρίνεται από την καρδιά, και Β-τύπου νατριουρητικό πεπτίδιο (BNP), ελέγχουν την λιπόλυση κατά την άσκηση, μέσω των υποδοχέων NPRA και NPRB στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Sengenés et al. 2000, Moro et al. 2007, Lafontan et al. 2008, de Glisezinski et al. 2009). Οι συγκεντρώσεις των νατριουρητικών πεπτιδίων αυξάνονται κατά τη διάρκεια της άσκησης (Moro et al. 2004) και η ενεργοποίηση των υποδοχέων NPRA οδηγεί στην παραγωγή κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης (cGMP), η οποία ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση G (PKG), με αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση κι ενεργοποίηση της HSL και της περιλιπίνης (Sengenés et al. 2003). Ενδιαφέρον είναι το εύρημα ότι η έκφραση NPRA στον ανθρώπινο λιπώδη ιστό σχετίζεται με την ρύθμιση της αιματικής ροής του λιπώδους ιστού (Perez-Matute et al. 2009) κι έτσι μπορεί τα νατριουρητικά πεπτίδια να ρυθμίζουν την απόκριση της αιματικής ροής κατά την άσκηση (Frayn 2010). Τέλος, βρέθηκε πως με έγχυση IL-6 ενεργοποιείται η λιπόλυση και η οξειδωση των λιπών (van Hall et al. 2003), ωστόσο η έγχυση IL-6 σε χαμηλής έντασης άσκηση δεν αύξησε την παράδοση ή την οξειδωση των λιπαρών οξέων (Hiscock et al. 2005).

Κατά τη διάρκεια της άσκησης, η εμφάνιση των ελεύθερων λιπαρών οξέων στο πλάσμα διπλασιάζεται ή τριπλασιάζεται σε σύγκριση με την ηρεμία (Romijn et al. 1993, van Hall et al. 2002, van Loon et al. 2003), ενώ ο ρυθμός απελευθέρωσης των ελεύθερων λιπαρών οξέων υπερβαίνει το ρυθμό οξείδωσής τους (Frayn 2010). Το αποτέλεσμα είναι, ένα μέρος των ελεύθερων λιπαρών οξέων του πλάσματος να επανεστεροποιείται με την 3-φωσφορική γλυκερόλη προς τριακυλογλυκερόλες. Η επανεστεροποίηση πραγματοποιείται στο ήπαρ με συνέπεια την έκκριση τριακυλογλυκερολών μέσω των VLDL, ενώ μέρος των ελεύθερων λιπαρών οξέων που παράγονται κατά την λιπόλυση στο λιπώδη ιστό επανεστεροποιούνται πριν εξέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος, συνιστώντας τη λεγόμενη πρωταρχική ή ενδοκυτταρική επανεστεροποίηση (Frayn 2010). Σε φυσιολογικού βάρους άτομα ο μέσος ρυθμός ανακύκλωσης των τριακυλογλυκερολών στο σύνολο της λιπώδους μάζας κυμαίνεται σε 100–300 g ανά ημέρα (Lafontan & Langin 2009). Έχει αναφερθεί ότι, κατά την ηρεμία, το 70 % των παραγόμενων από τη λιπόλυση λιπαρών οξέων επανεστεροποιούνται, κατά τη διάρκεια άσκησης το ποσοστό αυτό πέφτει στο 25–35 %, ενώ στην αρχή της αποκατάστασης ανεβαίνει στο 90 % (Wolfe et al. 1990). Ο μικρός βαθμός επανεστεροποίησης των λιπαρών οξέων κατά την άσκηση έχει βεβαιωθεί και από τους Mulla και συν. (2000).

### **Το σκηνικό της λιπόλυσης κατά την άσκηση**

Συνοψίζοντας, κατά την ηρεμία η HSL είναι διασκορπισμένη στο κυτταρόλυμα, ενώ οι δυο πρωτεΐνες σκαλωσιάς, περιλιπίνη-1 και CGI-58, είναι συνδεδεμένες και περιβάλλουν τα σταγονίδια λίπους των λιποκυττάρων προστατεύοντας τις τριακυλογλυκερόλες από τις λιπάσες. Η οξεία άσκηση οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης της cAMP, λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης κατεχολαμινών και της μειωμένης συγκέντρωσης ινσουλίνης, και σε αύξηση της συγκέντρωσης της cGMP, λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης νατριουρητικών πεπτιδίων (de Glisezinski et al. 2009). Η cAMP ενεργοποιεί την PKA, ενώ η cGMP ενεργοποιεί την PKG, οι οποίες και οι δυο φωσφορυλιώνουν την περιλιπίνη-1 και την HSL. Στην ενεργοποιημένη κατάσταση, η φωσφορυλίωση της περιλιπίνης-1 επάγει φυσικές αλλαγές στην επιφάνεια του σταγονιδίου λίπους, που διευκολύνουν την υδρόλυση των τριακυλογλυκερολών από τη φωσφορυλιωμένη HSL (Egan et al. 1992, Clifford et al. 2000, Watt et al. 2006, Fernandez et al. 2008, Lafontan & Langin 2009). Η φωσφορυλίωση της περιλιπίνης-1 προάγει επίσης την απελευθέρωση της CGI-58, η οποία προσδένεται κι ενεργοποιεί την ATGL, την λιπάση που κατά κύριο λόγο υδρολύει τις τριακυλογλυκερόλες προς διακυλογλυκερόλες (Ogasawara et al. 2010, Ogasawara et al. 2012). Έχει επιβεβαιωθεί ότι η ATGL είναι απαραίτητη για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών κατά την άσκηση (Schoiswohl et al. 2010), ενώ πρόσφα-



τες μελέτες έδειξαν ότι ποντίκια με έλλειψη ATGL και HSL εμφάνισαν μειωμένη απόδοση κατά την άσκηση (Fernandez et al. 2008, Huijsman et al. 2009). Αντίθετα, η μέγιστη πρόσληψη οξυγόνου και η αντοχή δεν επηρεάστηκαν σε ποντίκια με έλλειψη περιλιπίνης, ενώ η χρήση λιπών ως πηγής ενέργειας ήταν αυξημένη σε μέγιστης έντασης άσκηση (Beylot et al. 2012). Δεδομένου ότι οι υδατάνθρακες είναι η κύρια πηγή ενέργειας κατά την έντονη άσκηση, μπορεί η έλλειψη της περιλιπίνης να οδηγεί σε αυξημένη ικανότητα χρησιμοποίησης των λιπών ως πηγή ενέργειας κατά την άσκηση (Jeon & Kim 2012).

Σε ότι αφορά τις διαφορές της επίδρασης της άσκησης στη λιπόλυση μεταξύ λεπτών και παχύσαρκων ατόμων, τα δεδομένα είναι λίγα και αντιφατικά. Σε μερικές μελέτες έχει βρεθεί ότι η προκαλούμενη από την άσκηση λιπόλυση είναι μειωμένη σε παχύσαρκα άτομα σε σύγκριση με κανονικού βάρους άτομα (Stich et al. 2000, Ormsbee et al. 2009), γεγονός που αποδίδεται και σε μειωμένη έκφραση της HSL (Large et al. 1999, Langin et al. 2005), ενώ σε κάποιες άλλες μελέτες δεν βρέθηκαν διαφορές στο ρυθμό λιπόλυσης μεταξύ παχύσαρκων και λεπτών ατόμων (Borsheim et al. 2000, Chatzinikolaou et al. 2008). Η μειωμένη λιπόλυση σε παχύσαρκα άτομα αιτιολογείται και λόγω μεγαλύτερης εμπλοκής της  $\alpha_2$ -αδρενεργικής δραστηριότητας στα λιποκύτταρα των παχύσαρκων ατόμων (Mauriège et al. 1991, Stich et al. 2000, Moro et al. 2008), κάτι που όμως δεν επιβεβαιώθηκε στη μελέτη των Ormsbee και συν. (2009). Επιπλέον, έχει βρεθεί αντίσταση στην προκαλούμενη από τις κατεχολαμίνες λιπόλυση στον υποδόριο λιπώδη ιστό σε παχύσαρκα άτομα (Jensen et al. 1989, Bougnères et al. 1997, Langin et al. 2005) και αποδίδεται σε μειωμένη έκφραση των  $\beta_2$ -αδρενεργών υποδοχέων (Reynisdottir et al. 1994), ενώ σε δύο άλλες μελέτες δεν έχουν βρεθεί διαφορές με την άσκηση στην απόκριση των κατεχολαμινών μεταξύ λεπτών και παχύσαρκων ατόμων (Stich et al. 2000, Ormsbee et al. 2009). Εκτός από τις κατεχολαμίνες, και η προκαλούμενη από τα νατριουρητικά πεπτίδια λιπόλυση βρέθηκε μειωμένη στον υποδόριο λιπώδη ιστό παχύσαρκων ατόμων (Sengenès et al. 2002). Έχει βρεθεί ότι κατά τη διάρκεια χαμηλής και μέτριας έντασης άσκηση (30% και 50%  $\dot{V}O_2\max$ ) σε παχύσαρκα άτομα, η διέγερση της λιπόλυσης βασίζεται λιγότερο στις κατεχολαμίνες και περισσότερο στην αύξηση των νατριουρητικών πεπτιδίων και στη μείωση της ινσουλίνης στο πλάσμα (Moro et al. 2007, Moro et al. 2008). Τέλος, η αντιλιπολυτική δράση της ινσουλίνης μειώνεται με την άσκηση σε παχύσαρκα άτομα εξίσου με κανονικού βάρους άτομα (Korppo et al. 2010).

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι μελέτης της λιπόλυσης κατά την άσκηση είναι η μικροδιαπίδυση, η μέτρηση αρτηριοφλεβικών διαφορών, η έγχυση ιχνηθετών και η απομόνωση λιποκυττάρων. Σε αυτές τις μεθόδους στηρίζεται το μεγαλύτερο μέρος της γνώσης μας γύρω από την επίδραση της άσκησης στο ρυθμό λιπόλυσης. Κύριο όμως μειονέκτημά τους



είναι ότι αδυνατούν να εξετάσουν τον ενδοκυτταρικό μεταβολισμό του λιπώδους ιστού (Frayn et al. 1997). Επίσης, με αυτές τις μεθόδους δεν μπορούν να μελετηθούν ξεχωριστά οι παράγοντες που συμμετέχουν στη διαδικασία της λιπόλυσης για να εξακριβωθούν οι μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους η άσκηση επηρεάζει τη λιπόλυση στο λιπώδη ιστό. Έτσι, ενώ υπάρχει πληθώρα δεδομένων για το μηχανισμό της λιπόλυσης γενικά, η βιβλιογραφία είναι ελλιπής στη μελέτη της επίδρασης της άσκησης στους παράγοντες που συμμετέχουν στη λιπόλυση για την εύρεση του μηχανισμού μέσω του οποίου η άσκηση αυξάνει τη λιπόλυση στο λιπώδη ιστό. Η γνώση αυτή θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στο χώρο της υγείας για την αντιμετώπιση της παχυσαρκίας και των συνοδών της προβλημάτων. Επιπλέον, δίνεται έμφαση στη μελέτη της επίδρασης της άσκησης στη λιπόλυση στους σκελετικούς μύες, επειδή οι τελευταίοι παίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο στην άσκηση και αποτελούν το χώρο καύσης των προϊόντων της λιπόλυσης, με αποτέλεσμα τα δεδομένα της επίδρασης της άσκησης στη λιπόλυση στο λιπώδη ιστό, που αποτελεί την κύρια αποθήκη λίπους και πηγή των ελεύθερων λιπαρών οξέων, να είναι λιγότερα.

### **Γονιδιακή έκφραση και λιπόλυση στο λιπώδη ιστό**

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα δεδομένα για τη γονιδιακή έκφραση των συντελεστών της λιπόλυσης στο λιπώδη ιστό είναι περιορισμένα, αφορούν κυρίως την παχυσαρκία, και είναι αντιφατικά. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα mRNA της ATGL στον λιπώδη ιστό βρέθηκαν μειωμένα, αυξημένα ή χωρίς μεταβολή, ενώ τα πρωτεϊνικά επίπεδα της ATGL βρέθηκαν αμετάβλητα ή μειωμένα σε παχύσαρκα σε σύγκριση με κανονικού βάρους άτομα (Mairal et al. 2006, Ryden et al. 2007, Jocken et al. 2007, Steinberg et al. 2007, Berndt et al. 2008). Χαμηλότερη έκφραση της ATGL έχει αναφερθεί και στο λιπώδη ιστο παχύσαρκων ποντικών (Villena et al. 2004). Επίσης, έχει βρεθεί ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα της ATGL είναι μειωμένα με την παχυσαρκία και την αντίσταση στην ινσουλίνη, χωρίς να παρατηρείται αλλαγή στα επίπεδα mRNA της ATGL (Yao-Borengasser et al. 2011). Επίσης, στην ίδια μελέτη δεν βρέθηκαν διαφορές στα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης της CGI-58 με την παχυσαρκία (Yao-Borengasser et al. 2011). Τέλος, τα επίπεδα mRNA της HSL στον λιπώδη ιστό βρέθηκαν μειωμένα σε προπονημένα σε σύγκριση με απροπόνητα άτομα (Cho et al. 2011) και σε παχύσαρκα σε σύγκριση με λεπτά άτομα (Mairal et al. 2006, Berndt et al. 2007).

Στην πολύ πρόσφατη και, απ' όσο γνωρίζουμε, μοναδική μελέτη (Nielsen et al. 2011) που εξέτασε την επίδραση οξείας άσκησης στη γονιδιακή έκφραση συντελεστών της λιπόλυσης στο λιπώδη ιστό, τα επίπεδα mRNA και πρωτεϊνών της ATGL, της HSL, της CGI-58 και της G0S2 δεν μεταβλήθηκαν 30 min μετά από άσκηση διάρκειας 1 h στο 65% της  $VO_{2max}$ , ενώ

μετά από 72ωρη νηστεία βρέθηκαν μειωμένα τα επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης της G0S2 και αυξημένα τα πρωτεϊνικά επίπεδα της ATGL.

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί μέρος μιας ευρύτερης μελέτης της λιπόλυσης στο λιπώδη ιστό κατά τη διάρκεια 30λεπτης άσκησης μέτριας έντασης (60% VO<sub>2</sub>max). Έχει ήδη μετρηθεί η δραστηριότητα της λιπάσης των τριακυλογλυκερολών στο λιπώδη ιστό λεπτών και παχύσαρκων ατόμων κατά τη διάρκεια της άσκησης και βρέθηκε σημαντική αλληλεπίδραση της σύστασης σώματος (παχύσαρκοι και λεπτοί) και του χρόνου άσκησης, καθώς και σημαντική κύρια επίδραση του χρόνου στην ενζυμική δραστηριότητα (Petridou et al. 2009). Συγκεκριμένα, η ενζυμική δραστηριότητα αυξήθηκε σημαντικά στο 10ο λεπτό της άσκησης στους λεπτούς και επέστρεψε στα επίπεδα ηρεμίας στο 20ό και 30ό λεπτό, ενώ στους παχύσαρκους η ενζυμική δραστηριότητα ήταν σημαντικά υψηλότερη από την ηρεμία στο 20ό και 30ό λεπτό της άσκησης. Οι παχύσαρκοι είχαν σημαντικά υψηλότερη ενζυμική δραστηριότητα στο 20ό και 30ό λεπτό της άσκησης σε σύγκριση με τους λεπτούς, κάτι που υποδηλώνει παρατεταμένη λιπόλυση στο λιπώδη ιστό.

### **ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ**

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να εξετάσει αν η αυξημένη λιπόλυση που βρέθηκε στην προαναφερθείσα μελέτη στο λιπώδη ιστό λεπτών και παχύσαρκων ατόμων κατά τη διάρκεια 30λεπτης άσκησης, οφείλεται σε αύξηση της γονιδιακής έκφρασης σε επίπεδο mRNA των τριών λιπασών που συμμετέχουν στη λιπόλυση και δύο πρωτεϊνών, της περιλιπίνης-1 και της CGI-58, που παίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο στη δράση των λιπασών. Επιπρόσθετος σκοπός είναι να συμπληρωθεί το βιβλιογραφικό κενό σχετικά με την επίδραση της άσκησης στη γονιδιακή έκφραση πρωτεϊνών πρωταγωνιστών της λιπόλυσης στο λιπώδη ιστό κι επιπλέον να εξετάσει και διαφορές στους παράγοντες της λιπόλυσης με την παχυσαρκία.

## ΜΕΘΟΔΟΣ

### Δείγμα

Στη μελέτη έλαβαν μέρος εθελοντικά 14 ενήλικοι άντρες ηλικίας 21-24 ετών, από τους οποίους οι 7 ήταν λεπτοί (δείκτης σωματικής μάζας  $< 25 \text{ kg/m}^2$ , ποσοστό σωματικού λίπους  $< 15 \%$ ) και οι υπόλοιποι 7 ήταν παχύσαρκοι (δείκτης σωματικής μάζας  $> 30 \text{ kg/m}^2$ , ποσοστό σωματικού λίπους  $> 20 \%$ ). Οι εθελοντές ενημερώθηκαν γραπτά και προφορικά για το σχεδιασμό της έρευνας κατά την πρώτη τους επίσκεψη στο εργαστήριο και συμφώνησαν να συμμετάσχουν υπογράφοντας έντυπο συγκατάθεσης. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι.

### Προκαταρκτικές μετρήσεις

Κατά την πρώτη επίσκεψη των εθελοντών στο εργαστήριο μετρήθηκε η σωματική μάζα σε ηλεκτρονικό ζυγό της εταιρείας Seca (Hamburg, Γερμανία) με ακρίβεια 0,1 kg και το ύψος σε αναστημόμετρο ενσωματωμένο στον ίδιο ζυγό με ακρίβεια 0,1 cm. Από τα δεδομένα αυτά υπολογίστηκε ο δείκτης σωματικής μάζας (body mass index, BMI). Ο προσδιορισμός του σωματικού λίπους με τη μέθοδο της βιοηλεκτρικής αντίστασης έγινε με τη συσκευή Bodystat 1500 της εταιρείας Bodystat (Douglas, Ηνωμένο Βασίλειο). Στη συνέχεια, κάθε εθελοντής ποδηλάτησε δοκιμαστικά επί 30 min σε εργοποδηλάτο Monark 834E (Varberg, Σουηδία) για την εύρεση της ισχύος στην οποία θα ασκούσαν κατά την κύρια δοκιμασία. Για το σκοπό αυτόν, η ισχύς του εργοποδηλάτου αυξομειωνόταν κατά τη διάρκεια της ποδηλάτησης μέχρι να βρεθεί εκείνη, στην οποία η καρδιακή συχνότητα του ασκουμένου κυμαινόταν μεταξύ 125 και 130 σφ/min. Επίσης, μετρήθηκε η μέγιστη πρόσληψη οξυγόνου για κάθε εθελοντή. Κατά τη διάρκεια της άσκησης μετριόταν η καρδιακή συχνότητα, η πρόσληψη οξυγόνου και το αναπνευστικό πηλίκιο (respiratory exchange ratio, RER) με τον αναλυτή αερίων Oxycan Mobile (Yorba Linda, CA, ΗΠΑ).

### Πρωτόκολλο άσκησης

Τουλάχιστον μία εβδομάδα μετά την προκαταρκτική επίσκεψη, κάθε εθελοντής, ξεκούραστος και μετά από ολονύκτια νηστεία, προσήλθε στο εργαστήριο. Μετά από ηρεμία 15 min ποδηλάτησε επί 30 min στην ισχύ που βρέθηκε (κατά την προκαταρκτική επίσκεψη) να αυξάνει την καρδιακή του συχνότητα σε 125-130 σφ/min. Η τελευταία επιτυγχανόταν από το τρίτο λεπτό της ποδηλάτησης.

## **Βιοψία**

Η βιοψία πραγματοποιήθηκε από τον υποδόριο λιπώδη ιστό του άνω έξω τεταρτημορίου της γλουτιαίας περιοχής των εθελοντών με τη χρήση αποστειρωμένης βελόνας μεγάλου διαμέτρηματος (16 G), όπως περιγράφεται από τους Beynen και Katan (1985). Η δειγματοληψία γινόταν με τον εθελοντή σε καθιστή θέση και κατά προτίμηση από το δεξιό γλουτό. Αν κάποια δειγματοληψία προκαλούσε αιμάτωμα, οι επόμενες πραγματοποιούνταν στον αριστερό γλουτό. Πραγματοποιήθηκαν συνολικά 4 δειγματοληψίες λιπώδους ιστού. Η πρώτη δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε σε κατάσταση ηρεμίας, ενώ οι επόμενες στο 10ο, 20ό και 30ό λεπτό της άσκησης. Τα δείγματα βυθίζονταν σε υγρό άζωτο μέχρι να ολοκληρωθεί η πειραματική διαδικασία κι έπειτα φυλάσσονταν στους -80 °C μέχρι την ανάλυσή τους.

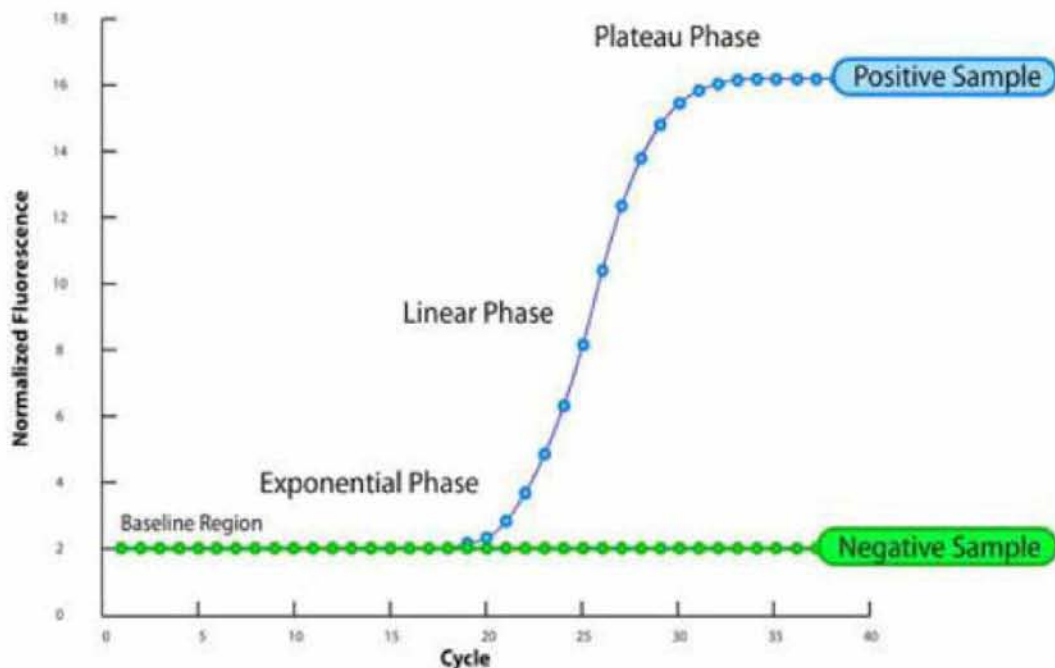
## **Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης**

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια τεχνική της μοριακής βιολογίας που επιτρέπει την αντιγραφή κι ενίσχυση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA (τμήμα γονιδίου). Η μέθοδος βασίζεται στην επαναλαμβανόμενη αντιγραφή ενός τμήματος DNA με τη βοήθεια μιας θερμοανθεκτικής πολυμεράσης και δύο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινήτων (primers) σχεδιασμένων με γνωστές αλληλουχίες. Έτσι, επιτυγχάνεται η σύνθεση των νέων συμπληρωματικών αλυσίδων με την προσθήκη νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο των εκκινήτων από την πολυμεράση. Κάθε κύκλος της αντίδρασης περιλαμβάνει τρία διαδοχικά στάδια: Αρχικά το δείγμα επωάζεται στους 94-95 °C για να αποδιαταχθεί το DNA (αποδιάταξη, denaturation), ακολούθως ψύχεται στους 50-65 °C για να υβριδοποιηθούν οι εκκινήτες με τις αποδιατεταγμένες αλυσίδες του DNA (υβριδοποίηση, annealing), κι έπειτα η θερμοκρασία αυξάνεται στους 70-72 °C προκειμένου να πραγματοποιηθεί ο πολυμερισμός με τη δράση της πολυμεράσης του DNA (επιμήκυνση, extension). Τα παραπάνω βήματα επαναλαμβάνονται πολλές φορές (περίπου 40 κύκλοι) σε ειδικά όργανα, τους θερμοκούς κυκλοποιητές έως ότου συντεθεί αρκετή ποσότητα του επιθυμητού προϊόντος (Κακάνη και συν. 2010).

Οι εκκινήτες είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια που έχουν μήκος 18-24 νουκλεοτίδια ο καθένας, είναι συμπληρωματικοί των αλληλουχιών στα άκρα κάθε κλώνου (πρόσθιος και οπίσθιος εκκινήτης, forward and reverse primer) κι έτσι καθορίζουν τα όρια του τμήματος DNA που θα ενισχυθεί. Η πολυμεράση του DNA (Taq polymerase) είναι ένα ένζυμο που απομονώνεται από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και βοηθάει στη σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου. Μέσα στο διάλυμα της PCR, εκτός από τους εκκινήτες, την πολυμεράση και το προς αντιγραφή τμήμα γονιδίου, υπάρχουν και τα 5' τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) που είναι απαραίτητα για τη σύνθε-

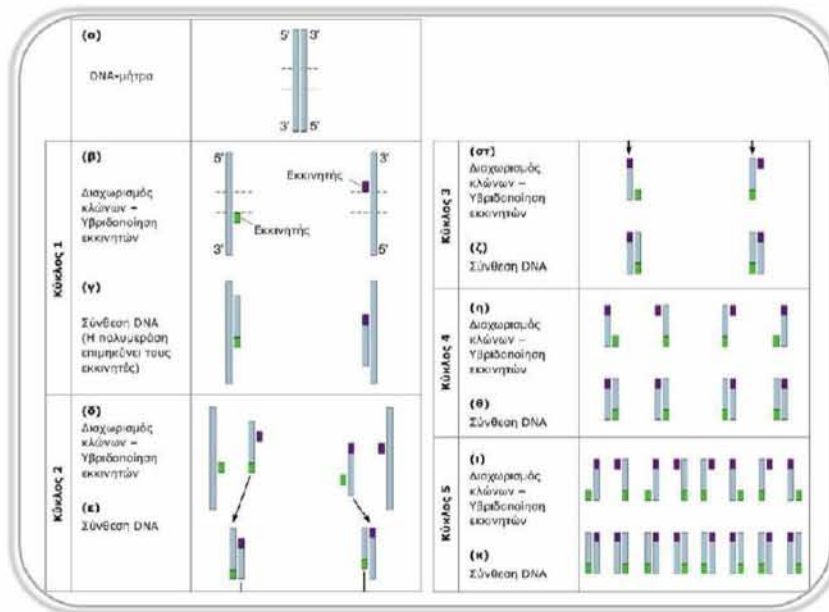
ση των συμπληρωματικών κλώνων, ιόντα μαγνησίου ( $Mg^{2+}$ ) που απαιτούνται για την ενίσχυση της ενζυμικής δραστηριότητας της πολυμεράσης του DNA και ένα ρυθμιστικό διάλυμα για τη διατήρηση του pH στις τιμές 7,5-8,0 (Κακάνη και συν. 2010).

Η PCR χωρίζεται στην εκθετική φάση (exponential), όπου η αντιγραφή της προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA είναι πολύ αποτελεσματική, στη γραμμική φάση (linear), όπου παρατηρείται μειωμένη παραγωγή αντιγράφων του γονιδίου στόχου λόγω μείωσης των υποστρωμάτων, και στη φάση πλατώ (plateau), όπου έχει σταματήσει η αντίδραση και η παραγωγή νέων αντιγράφων, λόγω εξάντλησης των υποστρωμάτων (Σχήμα 3).



**Σχήμα 3.** Οι φάσεις της PCR (<https://www.abbottmolecular.com/us/technologies/real-time-pcr/maxratio-data-analysis.html>).

Η PCR ολοκληρώνεται συνήθως μετά από 30-40 κύκλους, που είναι αρκετοί για τη σύνθεση δισεκατομμυρίων ως τρισεκατομμυρίων αντιγράφων του αρχικού τμήματος DNA. Σε κάθε κύκλο λαμβάνει χώρα ο διπλασιασμός του αριθμού των αντιγράφων του επιλεγμένου γονιδίου και τα νέα αντίγραφα χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για τον επόμενο κύκλο. Στο Σχήμα 4 παρουσιάζεται σχηματικά η τεχνική της PCR (Watson et al. 2007).



Σχήμα 4. Εκθετική αύξηση των αντιγράφων DNA κατά την PCR (Watson et al. 2007).

### PCR αντίστροφης μεταγραφής (Reverse transcription-PCR, RT-PCR)

Με την RT-PCR μπορούμε να μετρήσουμε τα επίπεδα mRNA ενός γονιδίου. Στην RT-PCR ως αρχικό δείγμα χρησιμοποιείται το RNA, το οποίο μετατρέπεται στο συμπληρωματικό του DNA (cDNA) με τη βοήθεια της αντίστροφης μεταγραφάσης. Για τη μεταγραφή αυτή χρησιμοποιούνται τυχαία εξαμερή ολιγονουκλεοτίδια ή ειδικοί εκκινητές συμπληρωματικοί προς την αλληλουχία στόχο. Αρχικά το δείγμα θερμαίνεται στους 65-70 °C για την αποδιάταξη του RNA κι έπειτα ακολουθεί επώαση στους 37-45 °C για τη σύνθεση, με εκμαγείο το RNA, του μονόκλωνου cDNA (Μαρκουλάτος & Τζανακάκη 2007). Το cDNA που παράγεται χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την πολυμεράση του DNA στην τεχνική της PCR.

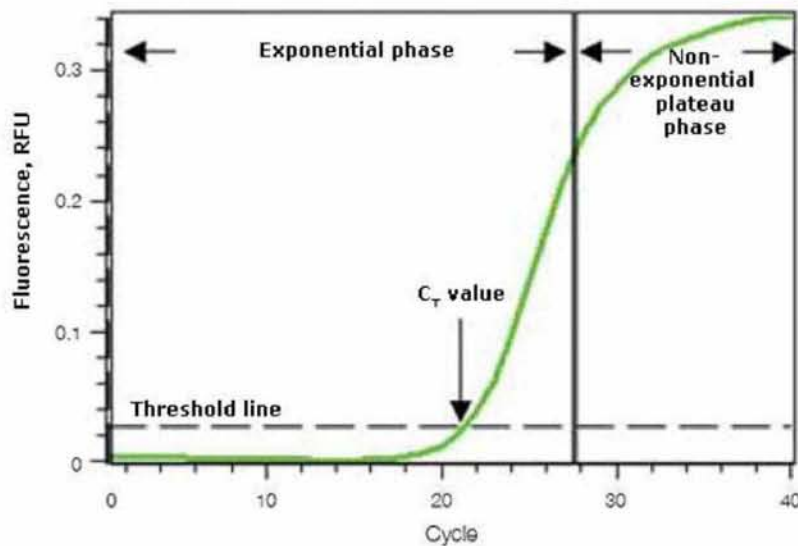
### Η PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)

Με την PCR πραγματικού χρόνου μπορεί να μελετηθεί η έκφραση ενός γονιδίου. Η αρχή της βασίζεται στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του φθορισμού που εκπέμπεται από ειδικά φθοριοχρώματα. Η PCR πραγματικού χρόνου αποτελεί μια παραλλαγή της συμβατικής PCR και χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό, την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA σε πραγματικό χρόνο. Συχνά αναφέρεται και ως quantitative Real-time PCR (q-PCR). Η αρχή λειτουργίας της είναι παρόμοια με αυτή της συμβατικής PCR, με τη διαφορά ότι η ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος μετριέται σε κάθε κύκλο, ενώ στη συμβατική PCR η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της αλληλουχίας στόχου λαμβάνει χώρα μετά την ολοκλήρωση του τελευταίου κύκλου. Το διάλυμα για την PCR πραγματικού χρόνου περιέχει τα ίδια αντιδραστήρια με αυτό της συμβατικής μεθόδου και επιπλέον κάποιες



χρωστικές για την ανίχνευση του γονιδίου στόχου. Έτσι, η μέτρηση της ποσότητας DNA που παράγεται μετά από κάθε κύκλο γίνεται μέσω σήμανσης των αντιγράφων με φθορίζοντα μόρια ή ιχνηθέτες (probes) που έχουν ενσωματωθεί στο προϊόν. Η ένταση του φθορισμού αυξάνεται ανάλογα με τον αριθμό των παραγόμενων αντιγράφων σε κάθε κύκλο της αντίδρασης.

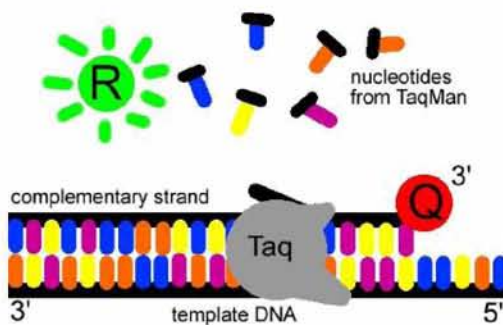
Σε ένα διάγραμμα q-PCR, ορίζουμε μια γραμμή κατωφλιού (threshold line) στο ύψος όπου το φθορίζον σήμα των προϊόντων ξεχωρίζει έντονα από το φόντο (εκθετική φάση). Ο κύκλος που αντιστοιχεί στο σημείο όπου η γραμμή έντασης φθορισμού τέμνει τη γραμμή κατωφλιού λέγεται threshold cycle ή  $C_t$  (Σχήμα 5). Όσο μεγαλύτερη είναι η αρχική ποσότητα της προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA σε ένα δείγμα, τόσο πιο νωρίς θα εισέλθει η γραμμή έντασης φθορισμού του στην εκθετική φάση, άρα τόσο μικρότερη τιμή  $C_t$  θα έχει.



**Σχήμα 5.** Τα κύρια χαρακτηριστικά ενός διαγράμματος q-PCR (Threshold line,  $C_t$  value) (<http://www3.bio-rad.com>).

Υπάρχουν δύο κύριες μέθοδοι ανίχνευσης των προϊόντων της PCR πραγματικού χρόνου. Η μία μέθοδος βασίζεται στη χρήση χρωστικών ουσιών (π.χ. SYBR Green) που παρεμβάλλονται μεταξύ ζευγών βάσεων σε δίκλωνο DNA και η άλλη βασίζεται στη χρήση ολιγονουκλεοτιδίων-ιχνηθετών (π.χ. TaqMan probes). Η χρωστική SYBR Green φθορίζει έντονο πράσινο χρώμα όταν ενσωματώνεται σε δίκλωνο DNA, ενώ, όταν βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα, εμφανίζει χαμηλό φθορισμό. Η ένταση του φθορισμού αυξάνεται συναρτήσει της συγκέντρωσης του DNA στο διάλυμα. Η μέθοδος αυτή είναι εύκολη στη χρήση της και έχει χαμηλό κόστος, γι' αυτό και προτιμάται από τους ερευνητές. Μειονέκτημά της είναι ότι δεν παρουσιάζει εξειδίκευση, καθώς η χρωστική μπορεί να δεθεί με ένα οποιοδήποτε τμήμα δίκλωνου DNA, ακόμα και με τμήμα που προήλθε από την υβριδοποίηση των εκκινητών μεταξύ τους (Λαζανάκη 2010).

Οι ιχνηθέτες TaqMan (TaqMan probes) είναι ολιγονουκλεοτίδια 20-30 βάσεων με αλληλουχία συμπληρωματική προς τμήμα του DNA που μας ενδιαφέρει να μετρήσουμε, που φέρουν στο 5' άκρο τους μια φθορίζουσα χρωστική (reporter fluorophore) μικρού μήκους κύματος (πράσινη) και στο 3' άκρο τους μια χρωστική απόσβεσης του φθορισμού (quencher fluorophore) μεγάλου μήκους κύματος (κόκκινη). Μετά την αποδιάταξη, υβριδοποιούνται με την αλληλουχία στόχο τόσο ο εκκινητής όσο και ο ιχνηθέτης (στα κατάντη του εκκινητή). Η πολυμεράση αρχίζει να προσθέτει νουκλεοτίδια στο 3' άκρο του εκκινητή και, λόγω της ταυτόχρονης δράσης της ως 5'-εξωνουκλεάσης, απομακρύνει ένα-ένα τα νουκλεοτίδια του ιχνηθέτη από το πρότυπο DNA για τη δημιουργία του συμπληρωματικού κλώνου (Σχήμα 6). Αυτό προκαλεί την απομάκρυνση της φθορίζουσας χρωστικής R από τον αποσβέστη Q και επιτρέπει την εκπομπή φθορίζοντος σήματος, το οποίο αυξάνεται ανάλογα με την αρχική ποσότητα του DNA στόχου στο δείγμα (Μαρκουλάτος & Τζανακάκη 2007).



**Σχήμα 6.** Αρχή λειτουργίας των ιχνηθετών TaqMan

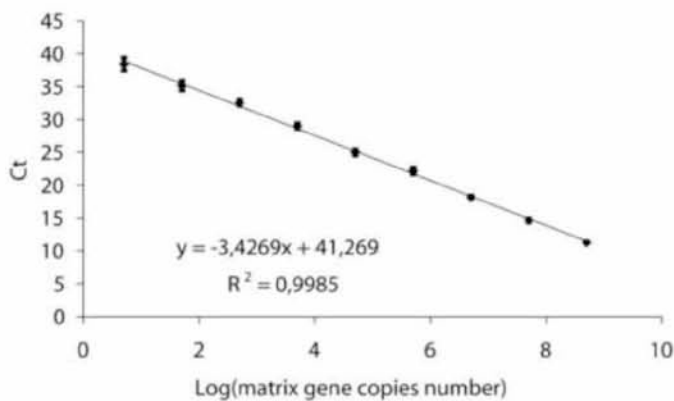
(<http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/Molstudents/spring2003/Pierce/realtimepcr.htm>).

Η μέθοδος TaqMan PCR πραγματικού χρόνου παρουσιάζει μεγαλύτερη ακρίβεια και εξειδίκευση από τη SYBR Green, καθώς ο εκάστοτε ιχνηθέτης σχεδιάζεται με βάση συγκεκριμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου στόχου και υβριδοποιείται μόνον όταν την εντοπίσει μέσα στο διάλυμα, διαφορετικά δεν φθορίζει καθόλου. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή παρέχει τη δυνατότητα σήμανσης των ιχνηθετών με διαφορετικές χρωστικές.

Στην PCR πραγματικού χρόνου, υπάρχουν δύο κύριες μέθοδοι ποσοτικοποίησης του προεπιλεγμένου γονιδίου: η απόλυτη ποσοτικοποίηση (absolute quantification), όπου μετριέται με ακρίβεια η ποσότητα του γονιδίου στόχου στο δείγμα, και η σχετική ποσοτικοποίηση (relative quantification), που είναι πιο απλή και εύκολη στην εφαρμογή της και χρησιμοποιείται όταν δεν είναι απαραίτητο για το πείραμα να μετρηθεί με ακρίβεια η αρχική ποσότητα (αντίγραφα) της αλληλουχίας στο δείγμα, αλλά ενδιαφέρουν μεταβολές της ποσότητας DNA ή mRNA (Pfaffl 2010).



Η μέθοδος της απόλυτης ποσοτικοποίησης βασίζεται στη δημιουργία και στη χρήση μιας πρότυπης καμπύλης αναφοράς (standard curve), με την οποία συγκρίνεται το φθορίζον σήμα που εκπέμπεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Για την δημιουργία αυτής της καμπύλης, επιλέγεται μια γνωστή συγκέντρωση του γονιδίου στόχου, που υφίσταται στη συνέχεια διαδοχικές αραιώσεις. Απαιτούνται τουλάχιστον 4 σημεία (γνωστές συγκεντρώσεις) που να καλύπτουν το εύρος των συγκεντρώσεων των υπό μελέτη δειγμάτων. Τα αραιωμένα δείγματα συμμετέχουν μαζί με τα προς ανάλυση δείγματα στην PCR πραγματικού χρόνου. Μετά το τέλος της αντίδρασης, η καμπύλη αναφοράς εμφανίζεται σε γράφημα ως μια ευθεία γραμμή που εκφράζει το  $C_t$  συναρτήσει του λογαρίθμου του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου (Σχήμα 7). Η ευθεία αυτή χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του αριθμού αντιγράφων στα υπό μελέτη δείγματα από τις αντίστοιχες τιμές  $C_t$ .



**Σχήμα 7.** Καμπύλη αναφοράς  $C_t$  ως συνάρτηση του λογαρίθμου του αριθμού αντιγράφων ενός γονιδίου (<http://www.springerimages.com>).

Η μέθοδος της σχετικής ποσοτικοποίησης, που χρησιμοποιείται και στην παρούσα εργασία, βασίζεται στη σύγκριση των τιμών  $C_t$  του δείγματος που μας ενδιαφέρει με ένα δείγμα που έχουμε ορίσει ως αναφορά. Ύστερα από μια αρχική φάση κατά την οποία δεν είναι ανιχνεύσιμο το προϊόν της PCR λόγω του ότι βρίσκεται σε πολύ μικρή ποσότητα, ακολουθεί μια εκθετική φάση κατά την οποία η ποσότητα του προϊόντος σχεδόν διπλασιάζεται σε κάθε βήμα. Το διάστημα αυτό είναι το καταλληλότερο για να γίνει η σύγκριση των τιμών  $C_t$  μεταξύ των δειγμάτων (Watson et al. 2007).

Για την μεγαλύτερη ακρίβεια των αποτελεσμάτων, είναι απαραίτητη η χρήση κατάλληλων ενδογενών γονιδίων (γονίδια αναφοράς), τα οποία πρέπει να τηρούν κάποιες προϋποθέσεις. Θα πρέπει να παρουσιάζουν συνεχή και σταθερή έκφραση στους υπό μελέτη ιστούς, δεν πρέπει να επηρεάζεται η έκφρασή τους από τις πειραματικές συνθήκες και πρέπει να παρουσιάζουν παρόμοια επίπεδα έκφρασης με αυτά του γονιδίου-στόχου. Συνήθως ως γονίδια αναφο-

ράς χρησιμοποιούνται mRNA διαχειριστικών γονιδίων, δηλαδή γονιδίων που συντηρούν την κυτταρική οικονομία (housekeeping genes) και χαρακτηρίζονται από την σταθερότητα της έκφρασής τους στον υπό μελέτη ιστό ανεξάρτητα από τον χρόνο και την πειραματική παρέμβαση. Για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης υπολογίζεται η διαφορά των τιμών  $C_i$  μεταξύ του υπό μελέτη γονιδίου και του γονιδίου αναφοράς. Η μέθοδος αυτή συνοψίζεται ως μέθοδος  $\Delta C_i$  (Livak & Schmittgen 2001). Η σχετική ποσοτικοποίηση μπορεί να γίνει ακόμη πιο χρήσιμη λαμβάνοντας υπόψη κι έναν δεύτερο παράγοντα συσχέτισης των επιπέδων έκφρασης, όπως είναι το χρονικό σημείο 0 ή ένα δείγμα ελέγχου (Pfaffl 2010). Αυτή η πιο περίπλοκη σχετική μέθοδος ποσοτικοποίησης συνοψίζεται ως μέθοδος  $\Delta\Delta C_i$  (Livak & Schmittgen 2001). Συνήθως χρησιμοποιούνται πάνω από ένα γονίδια αναφοράς, από τα οποία εξάγεται ένας ενιαίος δείκτης αναφοράς (Pfaffl et al. 2004).

Η αποτελεσματικότητα (Efficiency,  $E$ ) της PCR πραγματικού χρόνου πρέπει να είναι όσο πιο κοντά γίνεται στο 100%, για την εξασφάλιση αξιόπιστων και αναπαραγωγίμων αποτελεσμάτων. Η εκτίμηση της αποτελεσματικότητας πολλαπλασιασμού είναι σημαντικός δείκτης και απαιτείται διόρθωση με βάση έναν σταθερό δείκτη αποτελεσματικότητας όλων των δειγμάτων προκειμένου να έχουμε αξιόπιστη σύγκριση των αποτελεσμάτων. Υπολογίζεται από την κλίση της γραμμικής παλινδρόμησης μιας σειράς αραιώσεων σύμφωνα με την εξίσωση  $E = 10^{-1/κλίση}$  (Pfaffl 2010).

### **Απομόνωση RNA**

Για την απομόνωση του RNA από τα δείγματα του λιπώδους ιστού, ζυγίζονταν περίπου 100 mg λιπώδους ιστού σε φιαλίδιο eppendorf των 2 mL, ελεύθερο από RNάση, και ακολουθούσε ομογενοποίηση σε TissueRaptor (Qiagen, Germantown, MD, ΗΠΑ) με την προσθήκη 1 mL Trisure (κατασκευασής, πόλη). Τα δείγματα αφήνονταν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min, προσθέτονταν 200  $\mu$ L χλωροφορμίου και ακολουθούσε έντονη ανακίνηση για 15 s. Αφήνονταν και πάλι σε θερμοκρασία δωματίου για 2 min και φυγοκεντρώνταν στα 12.000 g για 15 min στους 2-8 °C. Γινόταν μεταφορά της υπερκείμενης στοιβάδας σε φιαλίδιο eppendorf των 1,5 mL, ελεύθερο από RNάση, αναμειγνυόταν με 0,5 mL 2-προπανόλης και αφήνόταν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Στη συνέχεια φυγοκεντρούσαμε στα 12.000 g για 10 min στους 2-8 °C, αφαιρούσαμε το υπερκείμενο και ξεπλέναμε το ίζημα προσθέτοντας 1 mL αιθανόλης 75 %, αναδεύοντας και φυγοκεντρώντας στα 7.500 g για 5 min στους 2-8 °C. Απομακρύναμε το υπερκείμενο, αφήναμε το ίζημα να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min κι έπειτα με ρεύμα αζώτου χωρίς να ξεραινεται τελείως, προσθέταμε 40  $\mu$ L νερού ελεύθερου από RNάση και επωάζαμε για 10 min στους 55-60 °C.

## **Μέτρηση RNA**

Όλες οι αναλύσεις από εδώ και πέρα έγιναν εις διπλούν για κάθε δείγμα. Για τη μέτρηση της συγκέντρωσης του RNA, τοποθετούσαμε 49  $\mu\text{L}$  ελεύθερου από RNάση σε ισάριθμα με τα δείγματα φιαλίδια erppendorf, ξεπαγώναμε τα δείγματα ανά 12άδες, αναδεύαμε το περιεχόμενο και πραγματοποιούσαμε σύντομη φυγοκέντρηση (spin down) για τη συγκέντρωση του περιεχομένου στον πυθμένα. Τοποθετούσαμε 1  $\mu\text{L}$  από κάθε δείγμα στο αντίστοιχο φιαλίδιο erppendorf, αναδεύαμε και πραγματοποιούσαμε spin down. Μεταφέραμε το περιεχόμενο σε μικροκυβελίδα χαλαζία και φωτομετρούσαμε στα 260 nm έχοντας ρυθμίσει το φωτόμετρο για την αραίωση των δειγμάτων (1 + 49). Η συγκέντρωση του RNA υπολογίζεται λαμβάνοντας υπόψη ότι 40  $\mu\text{g RNA/mL}$  έχουν απορρόφηση στα 260 nm ίση με 1. Καταγράψαμε τη συγκέντρωση σε  $\mu\text{g/mL}$  και τον λόγο 260/280 (για τον έλεγχο της καθαρότητας του RNA ως προς DNA, πρωτεΐνες και φαινόλες). Επίσης, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων RNA σε πήκτωμα αγαρόζης για τον έλεγχο πιθανού κατακερματισμού του. Τα δείγματα RNA αποθηκεύονταν στους  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  μέχρι τις επόμενες αναλύσεις.

## **Σύνθεση cDNA**

Για τη σύνθεση cDNA, ετοιμάσαμε το αντιδραστήριο Mastermix ανά 4 δείγματα αναμειγνύοντας 20  $\mu\text{L}$  από το αντιδραστήριο (5x, Invitrogen, Cat. No. 28025-021), 8  $\mu\text{L}$  μείγματος dNTPs (10 mM, Invitrogen, Cat. No. 10927-018), 2,4  $\mu\text{L}$  αναστολέα της RNάσης (2,500 U, 40 U/ $\mu\text{l}$ , Promega, Cat. No. N2111), 5  $\mu\text{l}$  αντίστροφης μεταγραφάσης και 9  $\mu\text{L}$  DTT (0,1 M). Προγραμματίζαμε τον θερμικό κυκλοποιητή (MJ Research, PTC-200) στους  $72\text{ }^\circ\text{C}$  για 2 min,  $42\text{ }^\circ\text{C}$  για 60 min και  $65\text{ }^\circ\text{C}$  για 10 min. Αφαιρούσαμε 1  $\mu\text{g RNA}$  από κάθε δείγμα σε φιαλίδιο των 0,2 mL ελεύθερο RNάσης, προσθέταμε 4  $\mu\text{L}$  από τους τυχαίους εκκινητές (random hexamers, Primer random p[dN]6, Roche, Cat. No. 1034731) και υπερκάθαρο νερό (Gibco) έως τα 10  $\mu\text{L}$  και αναμειγνύαμε καλά. Ακολουθούσε spin down και ξεκινούσαν οι κύκλοι στους  $72\text{ }^\circ\text{C}$  για 2 min (ο τελικός όγκος ρυθμιζόταν στα 25  $\mu\text{L}$ ). Όταν η αντίδραση έφτανε τους  $42\text{ }^\circ\text{C}$ , προσθέταμε 11,1  $\mu\text{L}$  του Mastermix στα φιαλίδια PCR και η αντίδραση συνεχιζόταν. Στο τέλος, προσθέταμε 25  $\mu\text{l}$  υπερκάθαρου νερού. Τα δείγματα cDNA αποθηκεύονταν στους  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  μέχρι τις επόμενες αναλύσεις.

## **PCR πραγματικού χρόνου (TaqMan)**

Η PCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκε με TaqMan Gene Expression Assays της εταιρείας Applied Biosystems της Life Technologies (CA, USA). Προσδιορίσαμε τα επίπεδα mRNA για τα γονίδια της ATGL (Assay ID Hs00386101\_m1, human PNPLA2 gene, UniGene Hs.654697), της HSL (assay ID Hs00943410\_m1, human LIPE gene, UniGene

Hs.656980), της MGL (Assay ID Hs00200752\_m1, human MGLL gene, UniGene Hs.277035), της περιλιπίνης-1 (Assay ID Hs00160173\_m1, human PLIN1 gene, UniGene Hs.103253) και της CGI58 (Assay ID Hs01104373\_m1, human ABHD5 gene, UniGene Hs.19385), καθώς και για δύο γονίδια αναφοράς (housekeeping genes), της  $\beta_2$ -μικροσφαιρίνης ( $\beta_2M$ ) και της  $\beta$ -ακτίνης. Στη μέθοδο αυτή κάθε assay είναι ένα φιαλίδιο που περιέχει 2 εκκινητές και έναν ιχνηθέτη TaqMan, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Είχαμε συνολικά 56 δείγματα cDNA (14 άτομα  $\times$  4 δειγματοληψίες) και μετρούσαμε το mRNA κάθε γονιδίου ανά 28 δείγματα εις διπλούν σε πλακίδιο PCR των 72 θέσεων, καταλαμβάνοντας συνολικά 58 θέσεις (28 δείγματα εις διπλούν και 2 τυφλά, που περιείχαν το μείγμα των εκκινητών και το μείγμα της PCR αλλά νερό αντί για cDNA προκειμένου να εξαλείψουμε την πιθανότητα επιμόλυνσης των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούσαμε). Ξεπαγώναμε τα δείγματα ανά 28άδες, τοποθετούσαμε 58 φιαλίδια για PCR στο πλακίδιο της PCR κι έπειτα ετοιμάζαμε το μείγμα της PCR για 60 δείγματα αναμειγνύοντας 555  $\mu$ L νερού, 75  $\mu$ L από το μείγμα των εκκινητών και 750  $\mu$ L από το Universal PCR Master Mix, platinum qPCR. Οι ποσότητες ανά δείγμα ήταν 9,25  $\mu$ L νερού, 1,25  $\mu$ L από το μείγμα των εκκινητών (για να επιτύχουμε συγκέντρωση  $1\times$  για κάθε εκκινητή) και 12,5  $\mu$ L του Master Mix. Έπειτα τοποθετούσαμε 23  $\mu$ L από το μείγμα για την PCR στα φιαλίδια και προσθέταμε 2  $\mu$ L από το cDNA, ενώ στα φιαλίδια με τα τυφλά προσθέταμε 2  $\mu$ L νερό. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 25  $\mu$ L και η αντίδραση έτρεχε για 40 κύκλους στον θερμικό κυκλοποιητή Rotor Gene RG-6000 (Corbett Research). Το πρόγραμμα στον θερμικό κυκλοποιητή ήταν 50 °C για 2 min, 95 °C για 10 min (αρχική αποδιάταξη), 40 κύκλοι στους 95 °C για 15 s (αποδιάταξη) και 60 °C για 60 s (υβριδοποίηση και επέκταση) και στο τέλος από τους 50 °C στους 95 °C με ρυθμό 0,5 °C ανά βήμα και αναμονή 5 s μετά από κάθε βήμα (τήξη). Για την ανάλυση των δεδομένων δημιουργήσαμε αραιώσεις από ένα τυχαίο δείγμα για κάθε γονίδιο προκειμένου να επιλέξουμε την καταλληλότερη τιμή  $C_t$ . Οι αραιώσεις ήταν 1/2, 1/4, 1/8 και 1/16, κι επιλέγαμε για κατώφλι  $C_t$  τη μέση περίπου της εκθετικής φάσης των αντιγράφων mRNA με αποτελεσματικότητα (efficiency) 0,97-0,99. Οι τιμές  $C_t$  προσδιορίστηκαν με το λογισμικό Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε αυθαίρετες μονάδες φθορισμού, που προέκυψαν (α) υπολογίζοντας για κάθε δείγμα το  $\Delta C_t$  με αφαίρεση του μέσου  $C_t$  των δύο γονιδίων αναφοράς από το  $C_t$  του υπό μελέτη γονιδίου, (β) υπολογίζοντας το  $\Delta\Delta C_t$  με αφαίρεση από το  $\Delta C_t$  κάθε δείγματος του μέσου  $\Delta C_t$  όλων των δειγμάτων ηρεμίας ( $t = 0$ ) και, τελικά, (γ) υπολογίζοντας τις αυθαίρετες μονάδες ως  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  για κάθε δείγμα.

### **Στατιστική επεξεργασία**

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή  $\pm$  τυπική απόκλιση. Η κατανομή όλων των εξαρτημένων μεταβλητών εξετάστηκε με δοκιμασία Shapiro-Wilk και βρέθηκε να μην διαφέρει σημαντικά από την κανονική. Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων έγινε με ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) κατά δύο παράγοντες (ομάδα  $\times$  χρόνος) με επανειλημμένες μετρήσεις στο χρόνο. Για τη σύγκριση των μέσων όρων της καρδιακής συχνότητας, της πρόσληψης οξυγόνου και του αναπνευστικού πηλίκου κατά τη διάρκεια της άσκησης μεταξύ των δύο ομάδων χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία  $t$  του Student. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο  $\alpha = 0.05$ .

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα σωματομετρικά στοιχεία των δύο ομάδων της μελέτης παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

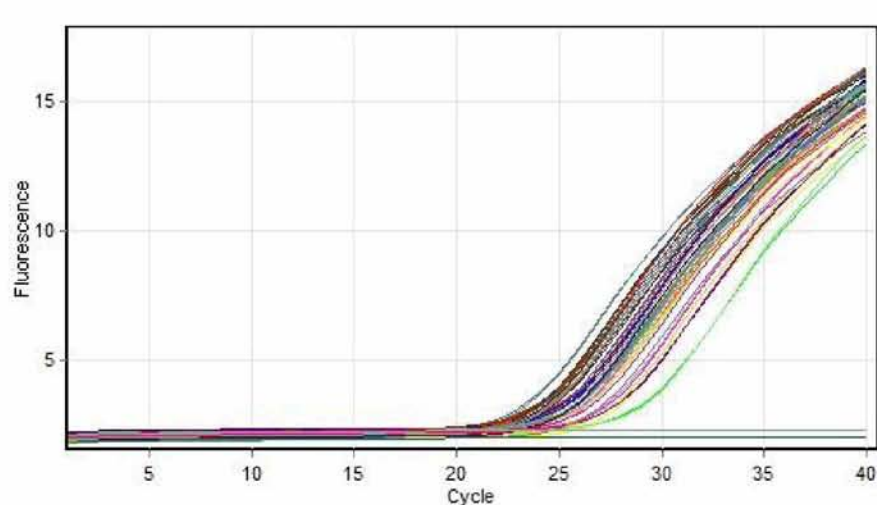
**Πίνακας 1.** Σωματομετρικά στοιχεία των δύο ομάδων.

	Λεπτοί (n = 7)	Παχύσαρκοι(n = 7)
Ηλικία (έτη)	21,6 ± 1,3	21,7 ± 0,8
Σωματική μάζα (kg)	81 ± 11	104 ± 14
Ύψος (m)	1,81 ± 0,11	1,78 ± 0,07
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24,9 ± 3,6	32,8 ± 3,0
Ποσοστό σωματικού λίπους (%)	13,2 ± 5,9	28,2 ± 2,9

Η μέση καρδιακή συχνότητα κατά τη διάρκεια της άσκησης ήταν  $127 \pm 7 \text{ b min}^{-1}$  για τους λεπτούς και  $128 \pm 8 \text{ b min}^{-1}$  για τους παχύσαρκους. Η μέση πρόσληψη οξυγόνου κατά τη διάρκεια της άσκησης ήταν σημαντικά υψηλότερη στους λεπτούς ( $24,7 \pm 2,3 \text{ ml kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) σε σύγκριση με τους παχύσαρκους ( $15,8 \pm 1,7 \text{ ml kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$   $p = 0,001$ ), ενώ το ποσοστό της μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των λεπτών ( $59 \pm 6 \%$ ) και των παχύσαρκων ( $61 \pm 10 \%$ ). Το RER ήταν σημαντικά χαμηλότερο στους λεπτούς ( $0,94 \pm 0,04$ ) σε σύγκριση με τους παχύσαρκους ( $0,98 \pm 0,05$ ), γεγονός που δηλώνει ότι οι λεπτοί είχαν υψηλότερη συνεισφορά των λιπών στην ενεργειακή δαπάνη της άσκησης.

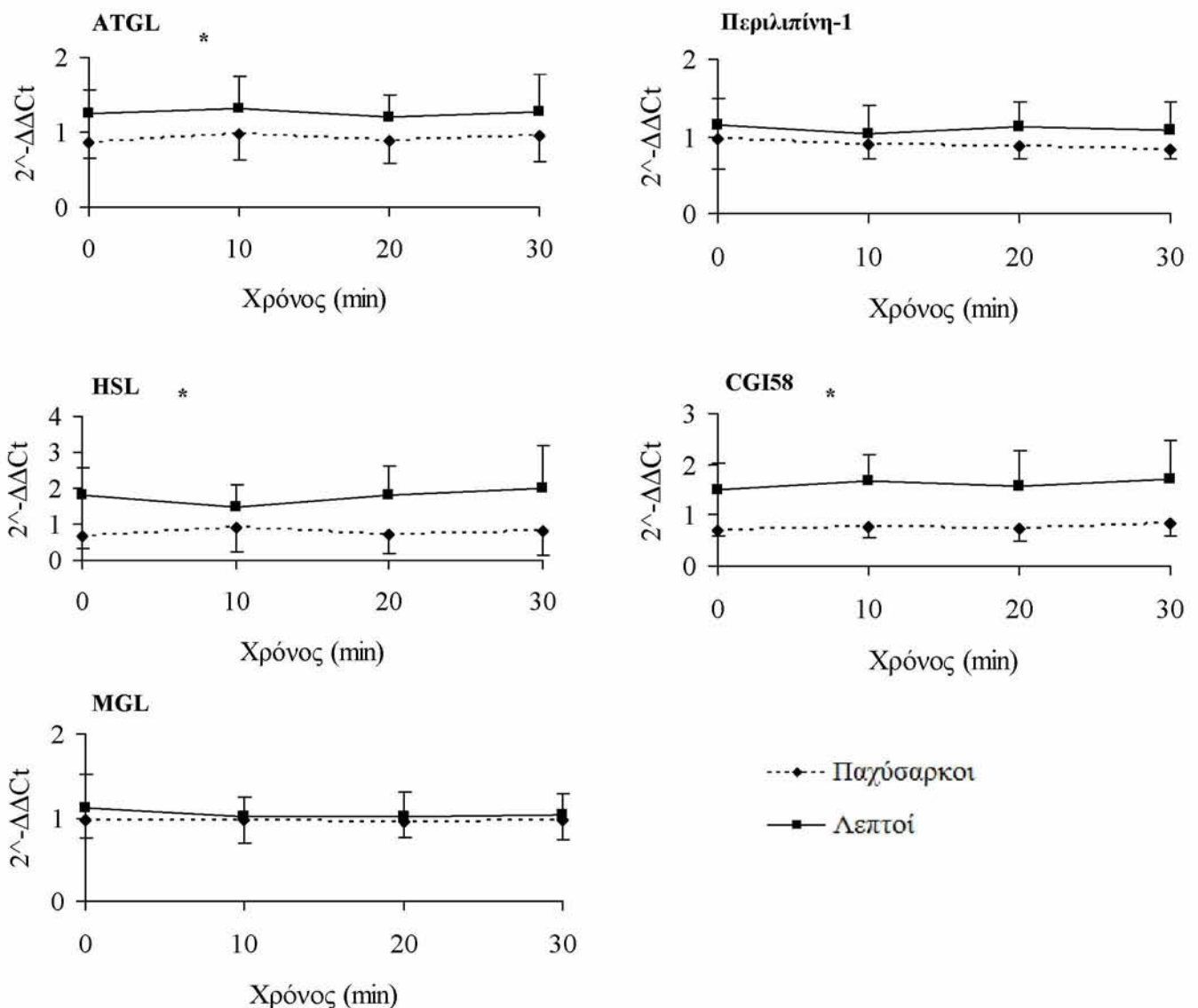
Η μέση συγκέντρωση RNA στα παρασκευάσματα από όλα τα δείγματα λιπώδους ιστού ήταν  $775 \text{ µg/mL}$ , ο λόγος απορρόφησης στα  $260/280 \text{ nm}$  ήταν 2,3 (τιμές 1,7-2,0 υποδεικνύουν ότι το δείγμα δεν έχει επιμολύνσεις από DNA και πρωτεΐνες) και η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων RNA ανέδειξε πολύ καλή ποιότητα, χωρίς ενδείξεις κατακερματισμού τους.

Στο Σχήμα 8 παρουσιάζεται ένα τυπικό γράφημα από αντιδράσεις του γονιδίου PLIN1 (περιλιπίνη-1) στον θερμικό κυκλοποιητή.



**Σχήμα 8.** Διάγραμμα αντιδράσεων περιλιπίνης-1 στον θερμικό κυκλοποιητή.

Σε ό,τι αφορά τα επίπεδα mRNA της ATGL, της HSL και της CGI58, δεν βρέθηκαν σημαντικές μεταβολές κατά τη διάρκεια της άσκησης ούτε αλληλεπίδραση της ομάδας με τον χρόνο, ενώ οι παχύσαρκοι είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα mRNA της ATGL ( $p = 0,04$ ), της HSL ( $p = 0,01$ ) και της CGI58 ( $p = 0,003$ ) από τους λεπτούς. Σε ό,τι αφορά τα επίπεδα mRNA της περιλιπίνης-1 και της MGL, δεν βρέθηκαν σημαντικές κύριες επιδράσεις του χρόνου (τα επίπεδα mRNA δεν παρουσίασαν σημαντικές μεταβολές κατά τη διάρκεια της άσκησης) ή της ομάδας (τα επίπεδα mRNA δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των παχύσαρκων και των λεπτών), αλλά ούτε και αλληλεπίδρασή τους (Σχήμα 9).



**Σχήμα 9.** Επίπεδα mRNA σε αυθαίρετες μονάδες ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) κατά τη διάρκεια 30λεπτης αερόβιας άσκησης. \* Σημαντικές διαφορές μεταξύ παχύσαρκων και λεπτών.



## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν να εξετάσει αν η αυξημένη λιπόλυση κατά τη διάρκεια 30λεπτης άσκησης οφείλεται σε αύξηση των επιπέδων mRNA των πρωτεϊνών πρωταγωνιστών της λιπόλυσης, ATGL, HSL, MGL, περιλιπίνης-1 και CGI-58. Επιπρόσθετος σκοπός ήταν να διερευνήσει πιθανές διαφορές στη μεταγραφή των παραπάνω γονιδίων μεταξύ παχύσαρκων και λεπτών ατόμων. Επίσης, σκοπός της μελέτης ήταν να καλύψει το βιβλιογραφικό κενό στην επίδραση οξείας άσκησης στη γονιδιακή έκφραση και συγκεκριμένα στη μεταγραφή πρωταγωνιστών της λιπόλυσης.

Για τη μελέτη επιλέχθηκαν άντρες, επειδή ο ρυθμός λιπόλυσης στις γυναίκες αυξάνεται από τα οιστρογόνα (Ruby & Robergs 1994). Οι εθελοντές είχαν παρόμοια ηλικία και χωρίστηκαν στις δύο ομάδες (παχύσαρκοι και λεπτοί) με βάση το ποσοστό σωματικού λίπους και το δείκτη σωματικής μάζας, όπως περιγράφεται στη Μέθοδο.

Επιλέχτηκε άσκηση μέτριας έντασης και διάρκειας, επειδή τέτοιου είδους άσκηση ενεργοποιεί τη λιπόλυση (όπως περιγράφηκε στη βιβλιογραφική ανασκόπηση) και είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη σε παχύσαρκα άτομα. Ο καθορισμός της έντασης της άσκησης μέσω της καρδιακής συχνότητας βρίσκεται πιο κοντά στις πραγματικές συνθήκες γύμνασης, αφού είναι ο πιο συνηθισμένος τρόπος καθορισμού της έντασης στην καθημερινότητα και έχει χρησιμοποιηθεί και από άλλους ερευνητές που ασχολούνται με τη λιπόλυση (De Glisezinski et al. 1998a, 1998b).

Τα γονίδια αναφοράς  $\beta_2M$  και  $\beta$ -ακτίνη, που χρησιμοποιήθηκαν για να υπολογιστούν τα επίπεδα mRNA των υπό μελέτη γονιδίων, έχουν σταθερή έκφραση στον λιπώδη ιστό, ανεξάρτητα από την πειραματική παρέμβαση, και είναι ευρέως χρησιμοποιούμενα στη βιβλιογραφία. Η  $\beta_2M$  αποτελεί τμήμα των ανθρώπινων λευκοκυτταρικών αντιγόνων τάξης I (Human Leucocyte Antigen, HLA-I), που εκφράζονται από όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα του οργανισμού (Todd & Spickett 2008). Η  $\beta$ -ακτίνη αποτελεί βασικό συστατικό όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων (και συγκεκριμένα του κυτταρικού σκελετού) και συμμετέχει σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες όπως είναι η κυτταρική διαίρεση, η κυτταρική κινητικότητα, η αλλαγή σχήματος και η φαγοκυττάρωση (Alberts et al. 2006).

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης είναι ότι 30λεπτη άσκηση μέτριας έντασης δεν προκάλεσε αλλαγές στα επίπεδα mRNA των τριών λιπασών, ATGL, HSL και MGL, καθώς και των πρωτεϊνών σκαλωσιάς, περιλιπίνης-1 και CGI-58, στο λιπώδη ιστό λεπτών και παχύσαρκων ανδρών. Επομένως, η αυξημένη δραστηριότητα λιπάσης των τριακυλογλυκερολών που βρέθηκε στα αρχικά πειράματα της έρευνας δεν οφείλεται σε αυξημένη μεταγραφή, αλλά πιθανώς σε μετα-μεταγραφική ρύθμιση, όπως είναι η αντιστρεπτή φωσφορυλίωση της HSL



και της περιλιπίνης-1. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματά μας είναι τα ευρήματα της μελέτης των Nielsen και συν. (2011), που δεν βρήκαν αλλαγές στα επίπεδα mRNA της ATGL, της HSL και της CGI-58 στο λιπώδη ιστό 30 min μετά από άσκηση 1 h στο 65% της  $VO_{2max}$ . Επίσης, διέγερση λιποκυττάρων με επινεφρίνη, γλυκαγόνη και αυξητική ορμόνη αύξησε τη δραστηριότητα της HSL, αλλά όχι τα επίπεδα mRNA της, και οι ερευνητές υποστηρίζουν μετα-μεταγραφικούς μηχανισμούς αύξησης της δραστηριότητας της HSL (Slavin et al. 1994).

Σε ό,τι αφορά τη σύγκριση των επιπέδων mRNA των υπό μελέτη γονιδίων μεταξύ παχύσαρκων και λεπτών ατόμων, βρέθηκε ότι τα παχύσαρκα άτομα είχαν χαμηλότερα επίπεδα mRNA της ATGL, της HSL και της CGI-58, ενώ δεν βρέθηκαν διαφορές μεταξύ των δυο ομάδων στα επίπεδα mRNA της MGL και της περιλιπίνης-1. Μειωμένα επίπεδα mRNA της ATGL σε υπόβαθρο παχυσαρκίας και αντίστασης στην ινσουλίνη βρέθηκαν και στη μελέτη των Berndt et al. (2007), ενώ στη μελέτη των Jocken et al. (2007) βρέθηκαν μειωμένα τα επίπεδα mRNA της ATGL και της HSL σε υπόβαθρο αντίστασης στην ινσουλίνη, ανεξάρτητα από τη λιπώδη μάζα. Οι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η αντίσταση στην ινσουλίνη και η υπερινσουλιναϊμία που συναντώνται στην παχυσαρκία, παρά το σωματικό λίπος ή η κατανομή του, σχετίζονται με την μειωμένη γονιδιακή έκφραση της ATGL και της HSL. Ομοίως, σε άλλη μελέτη δεν βρέθηκαν διαφορές στα επίπεδα mRNA της ATGL μεταξύ παχύσαρκων και μη ατόμων; (Mairal et al. 2006). Σε συμφωνία με τα μειωμένα επίπεδα mRNA της HSL στους παχύσαρκους της παρούσας μελέτης είναι και τα ευρήματα των Mairal και συν. (2006), που βρήκαν χαμηλότερα επίπεδα mRNA της HSL με την παχυσαρκία. Σε αντίθεση με την απουσία διαφοράς στα επίπεδα mRNA της περιλιπίνης-1 μεταξύ παχύσαρκων και λεπτών ατόμων στην παρούσα έρευνα, έχει παρατηρηθεί χαμηλότερη έκφραση της περιλιπίνης-1 στον λιπώδη ιστό παχύσαρκων ατόμων (Wang et al. 2003, Ray et al. 2009) κι έχει αποδοθεί σε πιθανό προσαρμοστικό μηχανισμό του οργανισμού στην προσπάθεια μείωσης της παχυσαρκίας (Beylot et al. 2012).

Συνοψίζοντας, 30λεπτή οξεία άσκηση δεν προκάλεσε μεταβολές στα επίπεδα mRNA της ATGL, της HSL, της MGL, της περιλιπίνης-1 και της CGI-58 στο λιπώδη ιστό λεπτών και παχύσαρκων ανδρών, παρόλο που η λιπόλυση ήταν αυξημένη κατά τη διάρκεια της άσκησης και στις δυο ομάδες. Το εύρημα αυτό υποδεικνύει ότι η αυξημένη λιπόλυση στο λιπώδη ιστό κατά τη διάρκεια οξείας άσκησης στηρίζεται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως είναι η αντιστρεπτή φωσφορυλίωση της HSL και της περιλιπίνης-1.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2006). Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας. 2η έκδοση. Ιατρικές εκδόσεις ΠΧ Πασχαλίδης, σ. 735.
- Arner P, Kriegholm E, Engfeldt P, Bolinder J (1990). Adrenergic regulation of lipolysis in situ at rest and during exercise. *J Clin Invest* 85, 893–898.
- Barbe P, Millet L, Galitzky J, Lafontan M, Berlan M. (1996). In situ assessment of the role of the beta 1-, beta 2- and beta 3-adrenoceptors in the control of lipolysis and nutritive blood flow in human subcutaneous adipose tissue. *Br J Pharmacol* 117, 907–13.
- Bartness TJ, Song CK (2007). Thematic review series: adipocyte biology. Sympathetic and sensory innervation of white adipose tissue. *J Lipid Res* 48, 1655–72.
- Berndt J, Kralisch S, Klötting N, Ruschke K, Kern M, Fasshauer M, Schön MR, Stumvoll M, Blüher M, Arner KN (2008). Adipose triglyceride lipase gene expression in human visceral obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 116(4), 203–210.
- Beylot M, Neggazi S, Hamlat N, Langlois D, Forcheron F (2012). Perilipin 1 ablation in mice enhances lipid oxidation during exercise and does not impair exercise performance. *Metabolism* 61, 415-423.
- Beynen AC, Katan MB (1985). Rapid sampling and long-term storage of subcutaneous adipose-tissue biopsies for determination of fatty acid composition. *American Journal of Clinical Nutrition* 42, 317-322.
- Bezaire V, Mairal A, Ribet C, Lefort C, Girousse A, Jocken J, et al (2009). Contribution of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase to lipolysis in human hMADS adipocytes. *J Biol Chem* 284: 18282–18291.
- Bickerton AS, Roberts R, Fielding BA, Tornqvist H, Blaak EE, Wagenmakers AJ, et al. (2008). Adipose tissue fatty acid metabolism in insulin-resistant men. *Diabetologia* 51, 1466–74.
- Boden G (1997). Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 46, 3–10.
- Borsheim E, Lonroth P, Knardahl S, Per-Anders J (2000). No difference in the lipolytic response to  $\beta$ -adrenergic stimulation in situ but a delayed increase in adipose tissue blood flow in moderately obese compared with lean men in the postexercise period. *Metabolism* 49, 579–587.

- Bougnères P, Stunff CL, Pecqueur C, Pinglier E, Adnot P, Ricquier D (1997). In vivo resistance of lipolysis to epinephrine: a new feature of childhood onset obesity. *J Clin Invest* 99, 2568–2573.
- Brasaemle DL, Dolios G, Shapiro L, Wang R (2004). Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 279, 46835–42.
- Brasaemle DL, Subramanian V, Garcia A, Marcinkiewicz A, Rothenberg A (2009). Perilipin A and the control of triacylglycerol metabolism. *Mol Cell Biochem* 326 (1-2), 15–21.
- Chatzinikolaou A, Fatouros I, Petridou A, Jamurtas A, Avloniti A, Douroudos I, Mastorakos G, Lazaropoulou C, Tournis S, Mitrakou A, Mougios V (2008). Adipose tissue lipolysis is upregulated in lean and obese men during acute resistance exercise. *Diabetes Care* 31, 1397–1399.
- Cho JK, Lee SH, Lee JY, Kang HS (2011). Randomized Controlled Trial of Training Intensity in Adiposity. *Int J Sports Med* 32, 468 – 475.
- Clifford GM, Londos C, Kraemer FB, Vernon RG, Yeaman SJ (2000). Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *J Biol Chem* 275, 5011-5015.
- Coe NR, Simpson MA, Bernlohr DA (1999). Targeted disruption of the adipocyte lipid binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty acid levels. *J Lipid Res* 40, 967–72.
- Cohen AW, Razani B, Schubert W, Williams TM, Wang XB, Iyengar P, et al. (2004). Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation. *Diabetes* 53, 1261–70.
- De Glisezinski I, Crampes F, Harant I, Berlan M, Hejnova J, Langin D, Riviere D, Stich V (1998a). Endurance training changes in lipolytic responsiveness of obese adipose tissue. *American Journal of Physiology* 275, E951-E956.
- De Glisezinski I, Harant I, Crampes F, Trudeau E, Felez A, Cottet-Emard JM, Garrigues M, Riviere D (1998b). Effect of carbohydrate ingestion on adipose tissue lipolysis during long-lasting exercise in trained men. *Journal of Applied Physiology* 84, 1627-1632.
- De Glisezinski I, Larrouy D, Bajzova M, Koppo K, Polak J, Berlan M, Bulow J, Langin D, Marques MA, Crampes F, Lafontan M, Stich V (2009). Adrenaline but not noradrenaline is a determinant of exercise-induced lipid mobilization in human subcutaneous adipose tissue. *J Physiol* 587, 3393–3404.

- Egan JJ, Greenberg AS, Chang M, Wek SA, Malcolm CM, Londos C (1992). Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: Translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89, 8537-8547.
- Evans K, Clark ML, Frayn KN (1999). Effects of an oral and intravenous fat load on adipose tissue and forearm lipid metabolism. *American Journal of Physiology* 276, E241-E248.
- Fernandez C, Hansson O, Nevsten P, Holm C, Klint C (2008). Hormone sensitive lipase is necessary for normal mobilization of lipids during submaximal exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E179–E186.
- Frayn KN (2001). Adipose tissue and the insulin resistance syndrome. *Proc Nutr Soc* 60, 375–380.
- Frayn KN (2010). Fat as a fuel: emerging understanding of the adipose tissue–skeletal muscle axis. *Acta Physiol* 199, 509–518.
- Frayn KN, Fielding BA, Summers LKM (1997). Investigation of human adipose tissue metabolism in vivo. *Journal of Endocrinology* 155, 187-189.
- Fredrikson G, Tornqvist H, Belfrage P (1976). Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochim Biophys Acta* 876, 288–93.
- Granneman JG, Moore HP, Granneman RL, Greenberg AS, Obin MS, Zhu Z (2007). Analysis of lipolytic protein trafficking and interactions in adipocytes. *J Biol Chem* 282, 5726–35.
- Granneman JGMH, Krishnamoorthy R, Rathod M (2009). Perilipin controls lipolysis by regulating the interactions of ABhydrolase containing 5 (Abhd5) and adipose triglyceride lipase (Atgl). *J Biol Chem* 284, 34538-44.
- Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, Garty NB, Blanchette-Mackie EJ, Londos C (1991). Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J Biol Chem* 266 (17), 11341–6.
- Hargreaves M (2000). Skeletal muscle metabolism during exercise in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27, 225–228.
- Hiscock N, Fischer CP, Sacchetti M, van Hall G, Febbraio MA, Pedersen BK (2005). Recombinant human interleukin-6 infusion during low-intensity exercise does not enhance whole body lipolysis or fat oxidation in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289, E2–E7.
- Holm C, Østerlund T, Laurell H, Contreras A. (2000). Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Annual Review of Nutrition* 20, 1-24.

- Horowitz JF, Klein S (2000). Lipid metabolism during endurance exercise. *American Journal of Clinical Nutrition* 72, 558S-563S.
- Horowitz JF, Leone TC, Feng W, Kelly DP, Klein S (2000). Effect of endurance training on lipid metabolism in women: a potential role for PPARalpha in the metabolic response to training. *American Journal of Physiology* 279, E348-E355.
- Huijsman E, van de Par C, Economou C, van der Poel C, Lynch GS, Schoiswohl G, Haemmerle G, Zechner R, Watt MJ (2009). Adipose triacylglycerol lipase deletion alters whole body energy metabolism and impairs exercise performance in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297, E505-13.
- Jensen MD, Haymond MW, Rizza RA, Cryer PE, Miles JM (1989). Influence of body fat distribution on free fatty acid metabolism in obesity. *J Clin Invest* 83, 1168–1173.
- Jeon JY, Kim YB (2012). Is perilipin critical in fat utilization during exercise? *Metabolism* 61, 291-292.
- Jocken JW, Langin D, Smit E, Saris WHM, Valle C, Hul GB, Holm C, Arner P, Blaak EE (2007). Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase protein expression is decreased in the obese insulin-resistant state. *J Clin Endocrinol Metab* 92(6), 2292–2299.
- Jocken JWE, Blaak EE (2008). Catecholamine-induced lipolysis in adipose tissue and skeletal muscle in obesity. *Physiology & Behavior* 94, 219–230.
- Karlsson M, Contreras JA, Hellman U, Tornqvist H, Holm C (1997). CDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases. *J Biol Chem* 272, 27218–23.
- Kimmel AR, Brasaemle DL, McAndrews-Hill M, Sztalryd C, Londos C (2010). Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins. *J Lipid Res* 51, 468–471.
- Klein S, Coyle EF, Wolfe RR (1995). Effect of exercise on lipolytic sensitivity in endurance-trained athletes. *Journal of Applied Physiology* 78, 2201-2206.
- Koppo K, Larrouy D, Marques MA, Berlan M, Bajzova M, Polak J, Van de Voorde J, Bulow J, Lafontan M, Crampes F, Langin D, Stich V, de Glisezinski I (2010). Lipid mobilization in subcutaneous adipose tissue during exercise in lean and obese humans. Roles of insulin and natriuretic peptides. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299, E258–E265.
- Kraemer FB, Shen W-J (2002). Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di)acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *J Lipid Res* 43, 1585–1594.

- Lafontan M, Langin D (2009). Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Progress in Lipid Research* 48, 275–297.
- Lafontan M, Moro C, Berlan M, Crampes F, Sengenès C, Galitzky J (2008). Control of lipolysis by natriuretic peptides and cyclic GMP. *Trends Endocrinol Metab* 19, 130–137.
- Langin D, Dicker A, Tavernier G, Hoffstedt J, Mairal A, Ryden M, Arner E, Sicard A, Jenkins CM, Viguerie N, van Harmelen V, Gross RW, Holm C and Arner P (2005). Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity. *Diabetes* 54, 3190–7.
- Large V, Reynisdóttir S, Langin D, Fredby K, Klannemark M, Holm C, Arner P (1999). Decreased expression and function of adipocyte hormone-sensitive lipase in subcutaneous fat cells of obese subjects. *J Lipid Res* 40, 2059–2066.
- Lass A, Zimmermann R, Haemmerle G, Riederer M, Schoiswohl G, Schweiger M, et al. (2006). Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin–Dorfman syndrome. *Cell Metab* 3, 309–19.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods* 25(4), 402–408.
- Mairal A, Langin D, Arner P, Hoffstedt J (2006). Human adipose triglyceride lipase (*PNPLA2*) is not regulated by obesity and exhibits low in vitro triglyceride hydrolase activity. *Diabetologia* 49 (7): 1629-1636.
- Martin WH (1996). Effects of acute and chronic exercise on fat metabolism. *Exercise and Sports Science Reviews* 24, 203-231.
- Mauriège P, Després JP, Prud'homme D, Pouliot MC, Marcotte M, Tremblay A, Bouchard C (1991). Regional variation in adipose tissue lipolysis in lean and obese men. *J Lipid Res* 32, 1625–1633.
- Mauriège P, Galitzky J, Berlan M, Lafontan M (1987). Heterogeneous distribution of beta and alpha-2 adrenoceptor binding sites in human fat cells from various fat deposits: functional consequences. *Eur J Clin Invest* 17, 156–65.
- Miyoshi H, Perfield 3rd JW, Souza SC, Shen WJ, Zhang HH, Stancheva ZS, Kraemer FB, Obin MS, Greenberg AS (2006). Control of ATGL action by serine 517 of perilipin A globally regulates PKA-stimulated lipolysis in adipocytes. *J Biol Chem* 282(2): 996-1002.
- Mora-Rodríguez R, Coyle EF (2000). Effects of plasma epinephrine on fat metabolism during exercise: interactions with exercise intensity. *American Journal of Physiology* 278, E669-E676.

- Moro C, Crampes F, Sengenès C, De Glisezinski I, Galitzky J, Thalamas C, Lafontan M, Berlan M (2004). Atrial natriuretic peptide contributes to physiological control of lipid mobilization in humans. *FASEB J* 18, 908–910.
- Moro C, Pillard F, de Glisezinski I, Crampes F, Thalamas C, Harant I, Marques M, Lafontan M, Berlan M (2007). Sex differences in lipolysis-regulating mechanisms in overweight subjects: effect of exercise intensity. *Obesity* 15, 2245–2255.
- Moro C, Pillard F, de Glisezinski I, Klimcakova E, Crampes F, Thalamas C, Harant I, Marques M-A, Lafontan M, Berlan M (2008). Exercise-induced lipid mobilization in subcutaneous adipose tissue is mainly related to natriuretic peptides in overweight men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E505–E513.
- Mulla NA, Simonsen L, Bulow J (2000). Post-exercise adipose tissue and skeletal muscle lipid metabolism in humans: the effects of exercise intensity. *Journal of Physiology* 524, 919-928.
- Nielsen TS, Vendelbo MH, Jessen N, Pedersen SB, Jørgensen JO, Lund S, Møller N (2011). Fasting, But Not Exercise, Increases Adipose Triglyceride Lipase (ATGL) Protein and Reduces G(0)/G(1) Switch Gene 2 (G0S2) Protein and mRNA Content in Human Adipose Tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 96(8), E1293–E1297.
- Nilsson NO, Stralfors P, Fredrikson G, Belfrage P (1980). Regulation of adipose tissue lipolysis: Effects of noradrenaline and insulin on phosphorylation of hormone-sensitive lipase and on lipolysis in intact rat adipocytes. *FEBS Letters* 111, 125-130.
- Ogasawara J, Nomura S, Rahman N, Sakurai T, Kizaki T, Izawa T, Ishida H, Haga S, Ohno H (2010). Hormone-sensitive lipase is critical mediators of acute exercise-induced regulation of lipolysis in rat adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 400, 134–139.
- Ogasawara J, Sakurai T, Kizaki T, Ishibashi Y, Izawa T, Sumitani Y, Ishida H, Radak Z, Haga S, Ohno H (2012). Higher Levels of ATGL Are Associated with Exercise-Induced Enhancement of Lipolysis in Rat Epididymal Adipocytes. *PLoS ONE* 7(7), e40876.
- Ormsbee M, Thyfault J, Johnson E, Kraus R, Choi M, Hickner R (2007). Fat metabolism and acute resistance exercise in trained men. *J Appl Physiol* 102, 1767–1772.
- Ormsbee MJ, Choi MD, Medlin JK, Geyer GH, Trantham LH, Dubis GS, Hickner RC (2009). Regulation of fat metabolism during resistance exercise in sedentary lean and obese men. *J Appl Physiol* 106, 1529 –1537.
- Pagnon J, Matzaris M, Stark R, Meex RCR, Macaulay SL, Brown W, O'Brien PE, Tiganis T, Watt MJ (2012). Identification and Functional Characterization of Protein Kinase A Phos-

- phorylation Sites in the Major Lipolytic Protein, Adipose Triglyceride Lipase. *Endocrinology* 153(9), 4278–4289.
- Perez-Matute P, Neville MJ, Tan GD, Frayn KN, Karpe F (2009). Transcriptional control of human adipose tissue blood flow. *Obesity* 17, 681–688.
- Petridou A, Mougios V (2002). Acute changes in triacylglycerol lipase activity of human adipose tissue during exercise. *J Lipid Res* 43, 1331-1334.
- Petridou A, Chatzinikolaou T, Michailidis I, Fatouros I, Jamurtas AZ, Mougios V (2009). Adipose tissue triacylglycerol lipase activity in lean and obese men during aerobic exercise. *14th Annual Congress of the European College of Sport Science -Book of Abstracts:* 144-145.
- Pfaffl MW (2010). Relative quantification. In: Real-time PCR. Published by International University Line (Editor: T. Dorak), p, 63-82.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26(6), 509–515.
- Ranallo RF, Rhodes EC (1998). Lipid metabolism during exercise. *Sports Medicine* 26, 29-42.
- Ray H, Pinteur C, Frering V, Beylot M, Large V (2009). Depot-specific differences in perilipin and hormone-sensitive lipase expression in lean and obese. *Lipids Health Dis* 8, 58.
- Reynisdottir S, Wahrenberg H, Carlström K, Rössner S, Arner P (1994). Catecholamine resistance in fat cells of women with upper-body obesity due to decreased expression of  $\beta$ 2-adrenoceptors. *Diabetologia* 37, 428–435.
- Romijn JA, Coyle EF, Sidossis LS, Castaldelli JF, Horowitz JF, Endert E, Wolfe RR (1993). Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *American Journal of Physiology* 265, E380-E391.
- Ruby BC, Robergs RA (1994). Gender differences in substrate utilisation during exercise. *Sports Medicine* 17, 393-410.
- Ryden M, Jocken J, Van H V, et al. (2007). Comparative studies of the role of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase in human fat cell lipolysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292(6), E1847–E1855.
- Ryden M, Jocken J, van Harmelen V, Dicker A, Hoffstedt J, Wiren M, Blomqvist L, Mairal A, Langin D, Blaak E, Arner P (2007). Comparative studies of the role of hormone sensitive lipase and adipose triglyceride lipase in human fat cell lipolysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292, E1847–55.



- Schiffelers SLH, Saris WHM, Boomsma F, Van Baak MA (2001).  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-adrenoceptor-mediated thermogenesis and lipid utilization in obese and lean men. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 2191–2199.
- Schoiswohl G, Schweiger M, Schreiber R, Gorkiewicz G, Preiss-Landl K, Taschler U, Zierler KA, Radner FPW, Eichmann TO, Kienesberger, Eder S, Lass A, Haemmerle G, Alsted TJ, Kiens B, Hoefl er G, Zechner R, Zimmermann R (2010). Adipose triglyceride lipase plays a key role in the supply of the working muscle with fatty acids. *J Lipid Res* 51, 490–499.
- Schweiger M, Schreiber R, Haemmerle G, Lass A, Fledelius C, Jacobsen P, Tornqvist H, Zechner R, Zimmermann R (2006). Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. *J Biol Chem* 281, 40236–40241.
- Sengenés C, Berlan M, de Glisezinski I, Lafontan M, Galitzky J (2000). Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. *FASEB J* 14, 1345–51.
- Sengenés C, Bouloumié A, Hauner H, Berlan M, Busse R, Lafontan M, Galitzky J (2003). Involvement of a cGMP-dependent pathway in the natriuretic peptide-mediated hormone-sensitive lipase phosphorylation in human adipocytes. *J Biol Chem* 278, 48617–48626.
- Sengenés C, Stich V, Berlan M, Hejnova J, Lafontan M, Pariskova Z, Galitzky J (2002). Increased lipolysis in adipose tissue and lipid mobilization to natriuretic peptides during low-calorie diet in obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26, 24–32.
- Shen WJ, Liang Y, Hong R, Patel S, Natu V, Sridhar K, et al. (2001). Characterization of the functional interaction of adipocyte lipid-binding protein with hormone sensitive lipase. *J Biol Chem* 276, 49443–8.
- Slavin BG, Ong JM, Kern PA (1994). Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. *J. Lipid Res* 35, 1535-1541.
- Steinberg GR, Kemp BE, Watt MJ. (2007). Adipocyte triglyceride lipase expression in human obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293(4), E958–E964.
- Stich V, de Glisezinski I, Crampes F, et al. (1999). Activation of antilipolytic  $\alpha$ (2)-adrenergic receptors by epinephrine during exercise in human adipose tissue. *Am J Physiol* 277, R1076–83.
- Stich V, De Glisezinski I, Crampes F, Hejnova J, Cottet-Emard JM, Lafontan M, Riviere D, Berlan M (2000). Activation of  $\alpha$ 2-adrenergic receptors impairs exercise-induced lipolysis in subcutaneous adipose tissue of obese subjects. *Am J Physiol* 279, R499–R504.
- Stralfors P, Honnor RC (1989). Insulin-induced dephosphorylation of hormone-sensitive lipase. *European Journal of Biochemistry* 182, 379-385.

- Subramanian V, Rothenberg A, Gomez C, Cohen AW, Garcia A, Bhattacharyya S, et al. (2004). Perilipin A mediates the reversible binding of CGI-58 to lipid droplets in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 279: 42062–71.
- Syu LJ, Saltiel AR (1999). Lipotransin: a novel docking protein for hormone-sensitive lipase. *Mol Cell* 4:109–15.
- Sztalryd C, Xu G, Dorward H, Tansey JT, Contreras JA, Kimmel AR, et al. (2003). Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *J Cell Biol* 161:1093–103.
- Todd I, Spickett G (2008). Lecture notes. Ανοσολογία. 5η έκδοση. Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιανού, Αθήνα, σ. 23.
- van Hall G, Bülow J, Sacchetti M, Al Mulla N, Lyngsø D, Simonsen L (2002). Regional fat metabolism in human splanchnic and adipose tissues; the effect of exercise. *J Physiol* 543, 1033–1046.
- van Hall G, Steensberg A, Sacchetti M, Fischer C, Keller C, Schjerling P, Hiscock N, Møller K, Saltin B, Febbraio MA, Pedersen BK (2003). Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 3005–3010.
- van Loon LJC, Greenhaff PL, Constantin-Teodosiu D, Saris WHM, Wagenmakers AJM (2001). The effects of increasing exercise intensity on muscle fuel utilisation in humans. *J Physiol* 536, 295–304.
- Villena JA, Roy S, Sarkadi-Nagy E, Kim K-H, Sul HS (2004). Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem* 279, 47066–47075.
- Wahrenberg H, Engfeldt P, Bolinder J, Arner P (1987). Acute adaptation in adrenergic control of lipolysis during physical exercise in humans. *American Journal of Physiology* 253, E383-E390.
- Wang TJ, Larson MG, Levy D, et al. (2004). Impact of obesity on plasma natriuretic peptide levels. *Circulation* 109, 594–600.
- Wang Y, Sullivan S, Trujillo M, Lee M, Scheider S, Brodin R, et al. (2003). Perilipin expression in human adipose tissues: effects of severe obesity, gender and depot. *Obes Res* 11, 930-6.
- Watson JD, Caudy AA, Myers RM, Witkowski JA (2007). Ανασυνδρασμένο DNA. Ακαδημαϊκές εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε., σσ. 126-138.

- Watt MJ, Holmes AG, Pinnamaneni SK et al. (2006). Regulation of HSL serine phosphorylation in skeletal muscle and adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290, E500–E508.
- Wolfe RR, Klein S, Carraro F, Weber JM (1990). Role of triglyceride-fatty acid cycle in controlling fat metabolism in humans during and after exercise. *American Journal of Physiology* 258, E382-E389.
- Yamaguchi T, Omatsu N, Matsushita S, Osumi T (2004). CGI-58 interacts with perilipin and is localized to lipid droplets. Possible involvement of CGI-58 mislocalization in Chanarin–Dorfman syndrome. *J Biol Chem* 279, 30490–7.
- Yang X, Lu X, Lombe's M, Rha GB, Chi YI, Guerin TM, Smart EJ, Liu J (2010). The G(0)/G(1) switch gene 2 regulates adipose lipolysis through association with adipose triglyceride lipase. *Cell Metab* 11, 194–205.
- Yao-Borengasser A, Varma V, Coker RH, Ranganathan G, Phanavanh B, Rasouli N, Kern PA (2011). Adipose triglyceride lipase expression in human adipose tissue and muscle. Role in insulin resistance and response to training and pioglitazone. *Metabolism* 60(7), 1012–1020.
- Zierath JR, Livingston JN, Thörne A, Bolinder J, Reynisdottir S, Lönnqvist F, Arner P (1998). Regional difference in insulin inhibition of non-esterified fatty acid release from human adipocytes: relation to insulin receptor phosphorylation and intracellular signalling through the insulin receptor substrate-1 pathway. *Diabetologia* 41, 1343-1354.
- Κακάνη Ε, Αυγουστίνος Α και Ματθιόπουλος Κ (2010). Φυλλάδιο Εργαστηριακών Ασκήσεων του μαθήματος Μοριακή Βιολογία ΙΙ. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας.
- Λαζανάκη Β. (2010). Η χρήση της Real Time PCR (RT-PCR) για την ανίχνευση γενετικά τροποποιημένων στελεχών βακτηρίου (*Escherichia coli*)». Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τμήμα Φυτικής παραγωγής, ΤΕΙ Κρήτης, Ηράκλειο.
- Μαρκουλάτος Π, Τζανακάκη Τ (2007). Εργαστηριακές ασκήσεις μικροβιολογίας-ιολογίας. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.